

Analisis Molekuler dan Fenotipe Galur F₂ Padi Inpari HDB/K15 yang Membawa Gen Mutan *sd1* Hasil Pengeditan Genom

(Molecular and Phenotypic Analyses of Inpari HDB/K15 F₂ Lines Containing *sd1* Mutant Gene Resulted from Genome Editing Method)

Clara S.A. Fitriyanti^{1,2*}, Suharsono^{1,3}, dan Tri Joko Santoso²

¹Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680 Indonesia
Telp. (0251) 8621257, Faks. (0251) 8621724; *E-mail: claarashinta@yahoo.com

²Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia

³Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680 Indonesia

Diajukan: 9 Agustus 2019; Direvisi: 16 Juni 2020; Diterima: 26 Juni 2020

ABSTRACT

Inpari HDB variety is resistant to bacterial leaf blight (BLB) disease, but due to its tall stature, the variety is susceptible to lodging. Inpari HDB with semidwarf stature, therefore, is of high interest for lodging resistant performance. *sd1* gene encoding GA20ox-2 enzyme is one of the genes responsible for imparting semidwarf stature of rice. In previous study, *sd1* mutant rice cv. Kitaake (K15) was developed by using CRISPR/Cas9 technology. The objective of this study was to analyze molecularly and phenotypically F₂ lines containing *sd1* mutant gene resulted from a cross between Inpari HDB and K15 to develop semidwarf Inpari HDB rice variety. Thirty F₂ Inpari HDB/K15 lines were analyzed at molecular level using DNA sequencing method together with phenotypic assessment of the lines to verify the integration of *sd1* mutant gene. DNA sequencing analysis showed that 9 out of the 30 F₂ Inpari HDB/K15 lines were *sd1* mutants. The remaining F₂ lines contained 17 heterozygotes and 4 nonmutants. All the nine mutant lines demonstrated shorter plant stature and showed more tiller number per plant compared to the nonmutant lines. The *sd1* mutant gene in the F₂ lines showed pleiotropic effects on panicle number and showed no effects on other traits, such as flowering time, panicle length, filled and unfilled grain percentages. This study showed the introduction of *sd1* mutant gene generated semidwarf Inpari HDB lines. The semidwarf Inpari HDB lines obtained from this research should be further evaluated to confirm their lodging resistant performances.

Keywords: Rice, semidwarf, GA20ox-2, CRISPR/Cas9, mutant.

ABSTRAK

Varietas Inpari HDB memiliki ketahanan terhadap penyakit hawar daun bakteri (HDB), namun memiliki postur yang tinggi sehingga rentan terhadap rebah. Perbaikan Inpari HDB dengan postur *semidwarf* diharapkan tahan terhadap rebah. Gen *sd1* mengode enzim GA20ox-2 yang memiliki peran penting dalam menentukan postur *semidwarf* pada padi. Pada penelitian sebelumnya, padi mutan *sd1* cv. Kitaake (K15) telah dihasilkan dengan menggunakan teknologi CRISPR/Cas9. Tujuan penelitian ini ialah menganalisis secara molekuler dan fenotipe galur F₂ hasil persilangan varietas Inpari HDB dengan galur K15 yang membawa gen mutan *sd1*. Sementara, tujuan jangka panjangnya ialah merakit varietas Inpari HDB dengan postur tanaman *semidwarf* yang tahan rebah. Sebanyak 30 galur F₂ Inpari HDB/K15 dianalisis secara molekuler dengan sekuensing DNA dan dievaluasi keragaan fenotipenya untuk mengonfirmasi integrasi gen mutan *sd1*. Hasil analisis sekuensing DNA menunjukkan bahwa 9 galur dari 30 galur F₂ Inpari HDB/K15 terkonfirmasi membawa alel gen mutan *sd1* dalam kondisi homozigot. Galur lainnya, 17 galur membawa alel mutan dalam kondisi heterozigot dan 4 galur termasuk galur nonmutan. Sembilan galur mutan *sd1* secara morfologi memiliki keragaan postur tanaman yang lebih pendek dengan jumlah anakan/tanaman yang lebih banyak dibanding dengan tetua Inpari HDB dan galur F₂ lainnya. Gen mutan *sd1* pada galur F₂ Inpari HDB/K15 memberikan efek pleiotropik berupa bertambahnya jumlah anakan/tanaman. Mutan *sd1* tidak memengaruhi karakter lain, seperti umur berbunga, panjang malai, dan persentase gabah isi dan gabah hampa. Dengan demikian, introduksi gen mutan *sd1* menghasilkan galur Inpari HDB yang mempunyai postur lebih pendek. Galur padi mutan tersebut perlu dievaluasi lebih lanjut ketahanannya terhadap rebah.

Kata kunci: Padi, *semidwarf*, GA20ox-2, CRISPR/Cas9, mutan.

PENDAHULUAN

Inpari HDB adalah varietas padi unggul yang tahan terhadap penyakit hawar daun bakteri (HDB). Inpari HDB merupakan hasil rakitan BB Biogen dari persilangan antara IR64 dan *Oryza rufipogon* yang telah dilepas oleh Menteri Pertanian RI pada tahun 2013 (Sasmita et al. 2019). Meskipun memiliki sifat ketahanan terhadap penyakit HDB, varietas Inpari HDB memiliki postur tanaman cukup tinggi sekitar 119 cm. Postur padi yang tinggi menyebabkan tanaman rentan rebah akibat hujan dan angin (Okuno et al. 2014). Hal tersebut dapat menyebabkan penurunan hasil, bahkan gagal panen. Untuk mengurangi risiko gagal panen pada musim penghujan, petani cenderung memilih varietas padi dengan karakter tinggi tanaman yang sedang sampai rendah. Berdasarkan hal tersebut, habitus varietas padi Inpari HDB perlu diperbaiki sehingga petani dapat memiliki varietas unggul yang tahan terhadap penyakit HDB dengan produktivitas yang tinggi dan tahan terhadap rebah.

Penelitian sebelumnya telah menemukan bahwa postur pendek yang dimiliki IR8 disebabkan oleh mutasi gen *sd1* (Sasaki et al. 2002). Gen *sd1* mengkode enzim GA20ox-2, yaitu enzim kunci dalam biosintesis giberelin (*gibberelic acid*, GA), hormon pertumbuhan tanaman. Mutasi yang terjadi pada gen *sd1* menyebabkan gangguan pada fungsi enzim GA20ox-2 sehingga memperpendek tinggi tanaman (Spielmeyer et al. 2002). Gen mutan *sd1* telah dianalisis dengan berbagai pendekatan dan terbukti bahwa lokus *sd1* mengendalikan karakter tinggi tanaman padi (Sasaki et al. 2002). Postur tanaman yang pendek hasil mutasi ini memiliki efek pleiotropik dengan jumlah anakan yang banyak, arsitektur daun yang tegak sehingga mampu menangkap energi cahaya lebih banyak, indeks panen yang lebih tinggi, dan tanaman lebih responsif terhadap pemupukan nitrogen yang meningkatkan produktivitas tanaman secara nyata (Hirano et al. 2017). Tomita dan Ishii (2018) melaporkan bahwa gen mutan *sd1* memiliki efek pleiotropik berupa jumlah anakan/tanaman yang lebih banyak dan produktivitas yang lebih tinggi, dengan kualitas beras, rasa, dan nutrisi tidak mengalami perubahan. Hal tersebut memberi inspirasi bahwa mutasi pada gen yang sama pada varietas padi Inpari HDB juga dapat dimanfaatkan untuk memperpendek postur tanaman sebagai upaya untuk mengurangi kemungkinan gagal panen akibat rebah.

Metode pengeditan genom (*genome editing*) merupakan teknologi mutakhir yang efektif untuk memutasi gen secara terarah pada berbagai orga-

nisme. Teknologi *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9) merupakan salah satu sistem pengeditan genom yang efisien, cepat, dan mudah dalam aplikasinya. Pada sistem ini, nuklease Cas9 berpasangan dengan *single guide* RNA (sgRNA) atau RNA penuntun tunggal dari gen target dan memotong sekuen target dengan dibantu oleh sekuen pengenalan *protospacer adjacent motif* (PAM) (Deveau et al. 2008; Mojica et al. 2009; Deltcheva et al. 2011). PAM akan membantu endonuklease Cas9 untuk membedakan DNA target dengan DNA asing lain sehingga hanya sekuen target yang akan terpotong atau termutasi (Jinek et al. 2012).

Sistem CRISPR/Cas9 memotong sekuen gen target secara terarah pada kedua utas sehingga menghasilkan potongan utas ganda. Sistem sel tubuh akan berusaha untuk memperbaiki potongan tersebut melalui mekanisme *Non-Homologous End Joining* (NHEJ). Melalui NHEJ, sel akan melakukan reparasi sekuen secara acak yang dapat berupa penghilangan atau penambahan satu atau beberapa nukleotida sehingga didapatkan tanaman mutan yang memiliki kodon akhir/terminal (*stop codon*) prematur (Bibikova et al. 2002).

Pemanfaatan teknik pengeditan genom CRISPR/Cas9 untuk *knockout* gen telah banyak dilakukan pada berbagai spesies tanaman untuk menghasilkan tanaman yang lebih unggul, seperti pada padi (Chen et al. 2013; Shan et al. 2013; Xu et al. 2014; Pan et al. 2016), jagung (Char et al. 2017), kentang (Butler et al. 2015), dan tomat (Pan et al. 2016). Santoso et al. (2016) telah berhasil melakukan pengeditan gen *sd1* pada padi model kultivar Kitaake menggunakan teknologi CRISPR/Cas9. Gen *sd1* yang telah termutasi menyebabkan padi Kitaake memiliki postur yang lebih pendek (dinamai K15) dibanding dengan Kitaake tipe liar (*wild type*). Untuk memperbaiki postur tinggi tanaman padi Inpari HDB sebenarnya dapat dilakukan dengan pendekatan yang sama, yaitu melalui pengeditan gen *sd1* pada varietas padi tersebut. Namun, karena sulitnya padi Inpari HDB untuk diregenerasikan melalui kultur jaringan setelah ditransformasi, pemendekan postur tinggi tanaman dilakukan dengan mengintroduksi gen mutan *sd1* melalui persilangan. Tujuan penelitian ini ialah menganalisis secara molekuler dan fenotipe galur F₂ hasil persilangan varietas Inpari HDB dengan galur K15 yang membawa gen mutan *sd1*. Sementara, tujuan jangka panjangnya ialah merakit varietas Inpari HDB dengan postur tanaman *semidwarf* yang tahan rebah.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei 2018 sampai dengan Februari 2019. Penelitian dilakukan di Rumah Kaca dan Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen), Cimanggu, Bogor.

Materi Penelitian

Materi genetik tanaman yang digunakan pada penelitian ini ialah 30 galur F₂ hasil persilangan Inpari HDB dengan galur K15. Varietas padi Inpari HDB sebagai tetua betina yang diperoleh dari peneliti pemulia BB Biogen dan galur padi mutan K15 hasil pengeditan genom sebagai tetua jantan yang membawa alel gen mutan *sd1* dan diperoleh dari peneliti BB Biogen (Santoso et al. 2016).

Penanaman dan Pemeliharaan Tanaman Galur F₂ Inpari HDB/K15

Benih galur F₂ Inpari HDB/K15 ditanam di dalam pot di rumah kaca dan dipelihara sampai tanaman menghasilkan biji. Pemeliharaan tanaman meliputi penyiraman tanaman secara rutin, pemupukan dengan pupuk NPK mengikuti standar pemupukan tanaman padi, dan pengendalian hama dan penyakit tanaman sesuai kebutuhan.

Isolasi, Analisis Kualitas dan Kuantitas DNA Genomik Galur F₂ Inpari HDB/K15

Selama pemeliharaan tanaman di rumah kaca, dilakukan pengambilan sampel daun muda untuk isolasi DNA genomik. DNA genomik total dari setiap galur F₂ Inpari HDB/K15 diisolasi dengan menggunakan prosedur CTAB (Doyle dan Doyle 1987). Kualitas DNA genomik dianalisis dengan menggunakan gel agarosa 1% dan kuantitas DNA diukur dengan *Nanodrop™ 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, AS). DNA genomik selanjutnya digunakan untuk analisis molekuler menggunakan teknik PCR dan sekuensing DNA.

Analisis PCR dan Sekuensing DNA galur F₂ Inpari HDB/K15

DNA genomik galur F₂ kemudian dianalisis PCR dengan primer spesifik gen *GA20* yang didesain mengagap daerah mutasi gen *sd1*. Volume reaksi PCR total setiap sampel adalah 20 µl yang terdiri atas 6 µl *nuclease-free water*, 10 µl *KAPA2G Fast ReadyMix* (Sigma-Aldrich, Jerman), 1 µl (10 pmol) primer

forward GA20 (5'-ATGTCTGTCCAGTGGCAACC-3'), 1 µl (10 pmol) primer *reverse* GA20 (5'-CACCATCGTTTTAATTACCCATT-3'), dan 30 ng DNA genomik setiap individu tanaman F₂. Program PCR yang digunakan ialah denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, diikuti dengan 34 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 95°C selama 15 detik, penempelan primer pada 53°C selama 15 detik, dan pemanjangan primer pada 72°C selama 15 detik. Pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 menit. Produk PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1% menggunakan bufer TBE. Produk PCR kemudian dipurifikasi dengan prosedur baku pemurnian DNA untuk sekuensing. DNA genomik hasil PCR setiap galur F₂ Inpari HDB/K15 dikirim ke laboratorium servis untuk proses sekuensing urutan basa nukleotidanya.

Pengamatan Keragaan Fenotipe Galur F₂ Inpari HDB/K15

Pengamatan fenotipe dilakukan pada galur F₂ Inpari HDB/K15 dan kedua tetuanya (Inpari HDB dan K15) sebagai pembanding. Parameter yang diamati meliputi tinggi tanaman, umur berbunga, jumlah anakan/tanaman, panjang malai, jumlah malai, jumlah gabah isi/malai, dan jumlah gabah hampa/malai.

Analisis Data

Data molekuler berupa data sekuen nukleotida dari daerah target mutasi terarah menggunakan CRISPR/Cas9 pada gen *sd1* dianalisis dengan menggunakan program *Omega ClustalW* secara *on-line* untuk mengidentifikasi keberadaan alel gen mutan *sd1* pada galur F₂ Inpari HDB/K15. Galur K15 membawa gen *sd1* mutan dengan insersi dua basa seperti dilaporkan sebelumnya (Santoso et al. 2016) (Gambar 1).

Analisis *Chi-Square* dilakukan untuk menguji pola pewarisan alel gen *sd1* dengan hipotesis awal bahwa progeni F₂ bersegregasi 1:2:1 (1 porsi galur dengan fenotipe tinggi tanaman normal : 2 porsi galur dengan fenotipe *intermediate* : 1 porsi galur dengan fenotipe *semidwarf*).

Data karakter fenotipe dianalisis dengan membandingkan nilai rata-rata dan simpangan baku dari setiap karakter di antara tiga kelompok galur F₂ Inpari HDB/K15 dengan kedua tetuanya (Inpari HDB dan K15). Hasil analisis data lalu ditampilkan dalam bentuk diagram batang.

Mutants Lines	Nucleotide sequence (5' - 3')	indel
WT	AATCTCATGGTGGCCGAGCACCCACGCCACCACAGCCGCACCAACCAACCGCCCATGGAC	Wild type
K6	AATCT---GGCGCCGAACACCCCGCCGCCACGGCCGCAACCCCGAGCCAGGGAC AATCTCA-----CCCATGGAC	nd, heterozygous
K14	AATCTCA-----CCCATGGAC	- 44, homo-dialelic
K15	AATCTCAATGGTGGCCGAGCACCCACGCCACCACAGCCGCACCAACCCACCGACCCATGG	+ 2, homo-dialelic
K19	AATCTCA-----CCCATGGAC	-44, homo-dialelic
K21	AATCTCATGGTGGCCGAGCACCCACGCCACCACAGCCGCACCAACCCCGCCCATGGAC	No mutation
K22	AATCTCA-----CCCATGGAC	-44, homo-dialelic
K23	TCTCTCG-----CCCGTGC-----TGGCC	nd, heterozygous
N24	AATCTCATGGTGGCCGAGCACCCACGCCACCACAGCCGCACCAACCCCGCCCATGGAC	No mutation
K25	AATCTCA-----CCCATGGAC	-44, homo-dialelic
K27	AATCTCAATGGTGGCCGAGCACCCACGCCACCACAGCCGCACCAACCCCGCCCGCG AATCTCA-----CCCATGGAC	nd, heterozygous

2 bp insertion induced a frameshift mutation

Gambar 1. Insersi dua basa A yang terjadi pada galur padi K15 setelah dilakukan pengeditan gen *sd1* menggunakan sistem pengeditan CRIPSR/Cas9 (Santoso et al. 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Molekuler Galur F₂ Inpari HDB/K5

Analisis molekuler dilakukan dengan sekuensing DNA gen *sd1* pada 30 galur F₂ hasil persilangan Inpari HDB dengan galur K15. Hasil analisis penyejajaran sekuen gen *sd1* menunjukkan bahwa 30 galur tanaman F₂ mempunyai motif sekuen *sd1* yang berbeda, terutama pada daerah yang menjadi target pengeditan genom (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat sembilan galur F₂ yang mempunyai alel gen mutan *sd1* dengan motif seperti pada tanaman K15. Hal ini ditandai dengan adanya insersi dua basa adenin (A) pada fragmen sekuen gen *sd1* pada galur-galur tersebut (Gambar 2). Galur dengan motif sekuen tersebut merupakan galur F₂ yang membawa gen *sd1* mutan dalam kondisi homozigot resesif seperti yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya (Santoso et al. 2016). Sementara itu, empat galur F₂ mempunyai motif sekuen DNA gen *sd1* persis sama dengan yang ditunjukkan oleh tetua varietas Inpari HDB dengan gen *sd1* sama sekali tidak mengalami mutasi (normal). Sebanyak 17 galur F₂ lainnya mempunyai motif sekuen alel gen *sd1* yang berbeda dengan tetua, baik Inpari HDB maupun K15, dan galur-galur tersebut merupakan galur dengan sekuen gen *sd1* dalam kondisi heterozigot (Gambar 2).

Galur padi K15 yang digunakan sebagai tetua jantan (donor gen mutan *sd1*) merupakan padi Kitaake yang mengalami mutasi pada gen *sd1* berupa insersi dua basa A (Gambar 1), setelah dilakukan pengeditan genom menggunakan teknologi CRISPR/Cas9 yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Santoso et al. 2016). Insersi dua basa A pada

sekuen gen *sd1* mengakibatkan pergeseran rangka baca (*frameshift*) (Gambar 2) dan menyebabkan adanya perubahan susunan asam amino pada produk protein gen tersebut. Mutasi insersi ini diduga menyebabkan gen *sd1* tidak mengekspresikan enzim GA20ox-2 secara sempurna karena munculnya *stop codon* di awal sehingga mengganggu biosintesis GA (Sasaki et al. 2002). Galur padi mutan *sd1* (K15) mempunyai kandungan GA yang berkurang sehingga pertumbuhan tanaman menjadi terganggu dan menyebabkan postur tanaman menjadi lebih pendek dibanding dengan tanaman Kitaake tipe liar. GA merupakan hormon yang termasuk ke dalam kelas diterpenoid yang berperan pada pengendalian berbagai aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Hal yang sama ditemukan pada varietas Dee-geo-woo-gen dari Taiwan, mutan *sd1* memiliki konsentrasi GA yang lebih rendah dibanding dengan tanaman tipe liar (Dello et al. 2007).

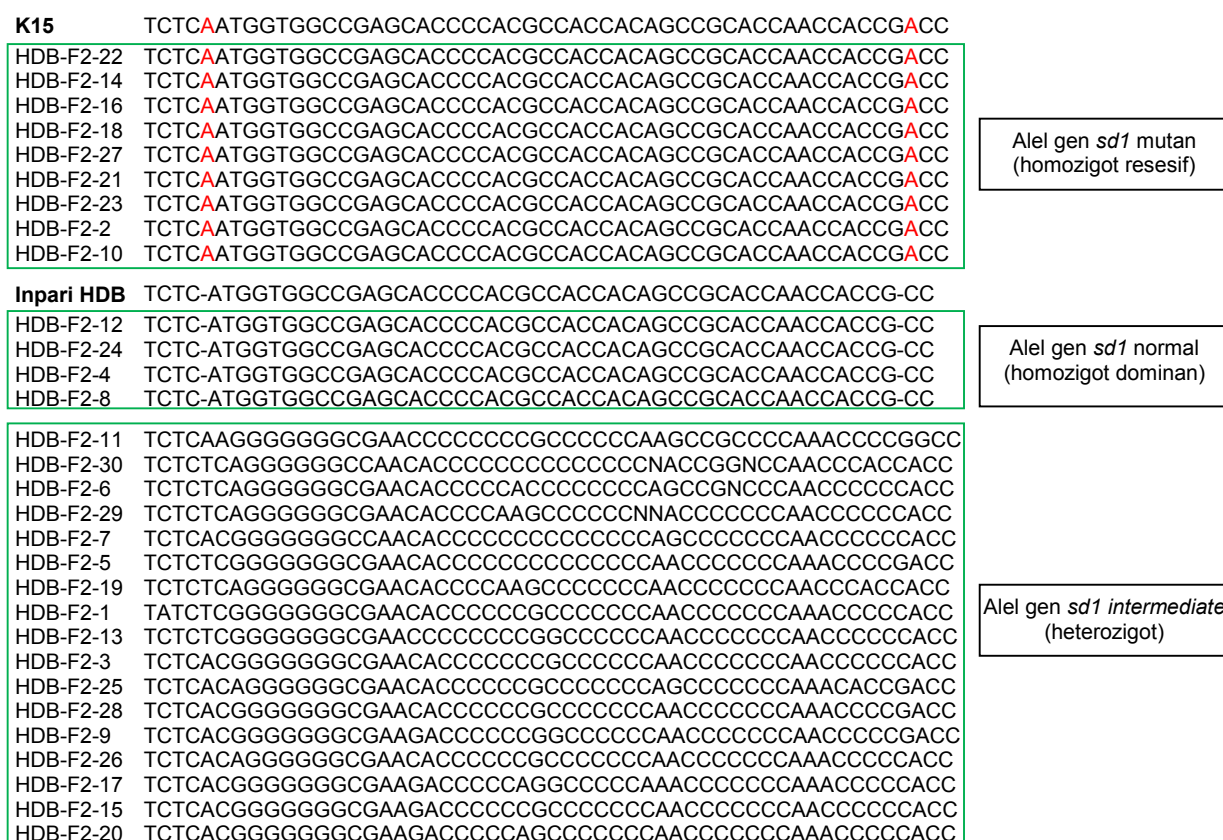
Populasi galur F₂ Inpari HDB/K15 pada penelitian ini bersegregasi untuk lokus *sd1*. Berdasarkan motif alel gen *sd1* dari hasil analisis sekuen, 30 galur F₂ tersebut dapat dikelompokkan menjadi tiga kategori dengan konstitusi genetik gen *sd1* yang berbeda, yaitu homozigot dominan (SS) dengan fenotipe tanaman normal (tinggi tanaman seperti Inpari HDB), heterozigot (Ss) dengan fenotipe tinggi tanaman *intermediate* (mempunyai sifat kedua tetua), dan homozigot resesif (ss) dengan fenotipe *semidwarf* (dengan keragaan fenotipe seperti tanaman mutan K15). Alel gen *sd1* mutan pada tanaman K15 merupakan alel gen tunggal dalam kondisi homozigot resesif maka populasi F₂ bersegregasi dengan pola pewarisan yang mengikuti segregasi Mendel gen tunggal kodominan dengan rasio 1:2:1. Hasil

penelitian serupa dilaporkan sebelumnya (Chen et al. 2013). Hasil analisis *Chi-Square* menunjukkan bahwa 30 galur F₂ Inpari HDB/K15 mempunyai pola pewarisan gen *sd1* yang mengikuti pola segregasi 1:2:1 (Tabel 1). Informasi konstitusi genetik ini dapat digunakan untuk menganalisis keterkaitan terjadinya mutasi gen *sd1* dengan keragaan karakter-karakter fenotipe pada galur F₂ tersebut.

Analisis Fenotipe Galur F₂ Inpari HDB/K15

Perbandingan pola alel gen *sd1* pada galur F₂ Inpari HDB/K15 dengan karakter tinggi tanaman me-

nunjukkan adanya keterkaitan antara kedua parameter tersebut (Tabel 2, Gambar 3). Pada Tabel 2 terlihat bahwa galur F₂ yang membawa gen *sd1* mutan homozigot resesif (Inpari HDB/K15 mutan) memiliki postur lebih pendek dibanding dengan galur F₂ lainnya dengan rata-rata tinggi tanaman 77,2 cm. Perubahan postur tanaman yang menjadi lebih pendek diduga disebabkan oleh pengaruh gen *sd1* mutan yang berhasil terintrogressi ke dalam genom galur F₂ tersebut. Gen *sd1* mutan menyebabkan enzim GA20ox-2 tidak berfungsi secara normal pada proses biosintesis GA dan menghasilkan penurunan



Gambar 2. Penyejajaran sekuen gen *sd1* pada 30 galur F₂ Inpari HDB/K15 dibandingkan dengan tetua Inpari HDB dan K15. Basa A dengan warna merah merupakan basa insersi pada gen *sd1* dan menyebabkan terjadinya mutasi gen. Basa-basa di dalam kotak berwarna hijau merupakan fragmen yang diapit dan menjadi target pengeditan gen, terdapat sekuen PAM untuk target CRISPR/Cas9 yang dikombinasikan dengan gRNA1 dan gRNA2.

Tabel 1. Hasil analisis *Chi-Square* galur F₂ Inpari HDB/K15 untuk gen *sd1* yang memengaruhi karakter tinggi tanaman.

Kelas genotype*	O	E	d : [O-E]	d ² /E
SS	4	7,5	3,5	1,633
Ss	17	15,0	2,0	0,267
ss	9	7,5	1,5	0,300
χ ² _h				2,2

*SS dengan fenotipe tinggi tanaman normal seperti Inpari HDB, Ss dengan fenotipe tinggi tanaman *intermediate*, dan ss dengan fenotipe tinggi tanaman *semidwarf*.

konsentrasi hormon GA20 di dalam tanaman yang menghambat pertumbuhannya, terutama untuk karakter tinggi tanaman. Enzim GA20ox-2 diketahui memengaruhi beberapa aspek penting pertumbuhan tanaman (Dello et al. 2007). Dengan postur yang lebih pendek, galur Inpari HDB/K15 mutan menjadi lebih kokoh, tidak mudah rebah akibat terpaan angin dan

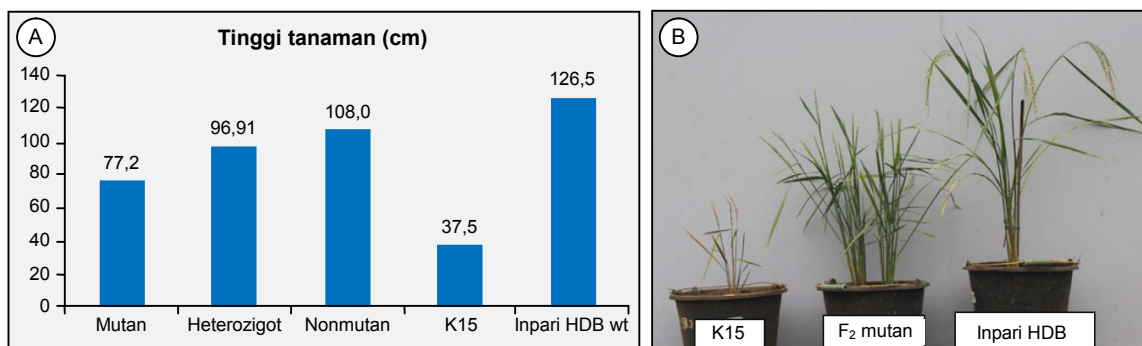
hujan. Hasil serupa telah dilaporkan oleh Tomita dan Ishii (2018) yang menunjukkan bahwa padi HIKARISHINSEIKI yang membawa gen *sd1* mutan memiliki postur yang lebih pendek.

Keragaan karakter jumlah anakan per tanaman menunjukkan bahwa galur F₂ Inpari HDB/K15 mutan

Tabel 2. Keragaan tinggi tanaman 30 galur F₂ Inpari HDB/K15 dan kedua tetuanya berdasarkan kondisi alel gen *sd1*.

No.	Galur F ₂	Pola alel gen mutan <i>sd1</i>	Konstitusi genotipe	Tinggi tanaman (cm)
1.	HDB-F2-1	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	111,0
2.	HDB-F2-2	Mengikuti alel K15	Mutan Ga20ox-2	83,5
3.	HDB-F2-3	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	82,5
4.	HDB-F2-4	Mengikuti alel HDB-K	Nonmutan	98,0
5.	HDB-F2-5	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	70,3
6.	HDB-F2-6	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	112,5
7.	HDB-F2-7	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	97,9
8.	HDB-F2-8	Mengikuti alel HDB-K	Nonmutan	97,7
9.	HDB-F2-9	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	112,0
10.	HDB-F2-10	Mengikuti alel K15	Mutan Ga20ox-2	75,0
11.	HDB-F2-11	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	78,3
12.	HDB-F2-12	Mengikuti alel HDB-K	Nonmutan	127,3
13.	HDB-F2-13	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	90,4
14.	HDB-F2-14	Mengikuti alel K15	Mutan Ga20ox-2	56,5
15.	HDB-F2-15	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	107,0
16.	HDB-F2-16	Mengikuti alel K15	Mutan ga20ox-2	84,3
17.	HDB-F2-17	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	111,5
18.	HDB-F2-18	Mengikuti alel K15	Mutan Ga20ox-2	88,5
19.	HDB-F2-19	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	108,0
20.	HDB-F2-20	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	101,2
21.	HDB-F2-21	Mengikuti alel K15	Mutan Ga20ox-2	88,5
22.	HDB-F2-22	Mengikuti alel K15	Mutan Ga20ox-2	71,0
23.	HDB-F2-23	Mengikuti alel K15	Mutan Ga20ox-2	74,2
24.	HDB-F2-24	Mengikuti alel HDB-K	Nonmutan	109,0
25.	HDB-F2-25	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	87,2
26.	HDB-F2-26	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	86,0
27.	HDB-F2-27	Mengikuti alel K15	Mutan Ga20ox-2	73,3
28.	HDB-F2-28	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	96,3
29.	HDB-F2-29	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	100,2
30.	HDB-F2-30	Tidak ikut alel HDB-K atau K15	Heterozigot	95,5
K15		Alel mengalami mutasi insersi dua basa	Mutan Ga20ox-2	37,5
Inpari HDB		Alel tidak mengalami mutasi	Nonmutan	126,5

HDB-K = Inpari HDB kontrol.



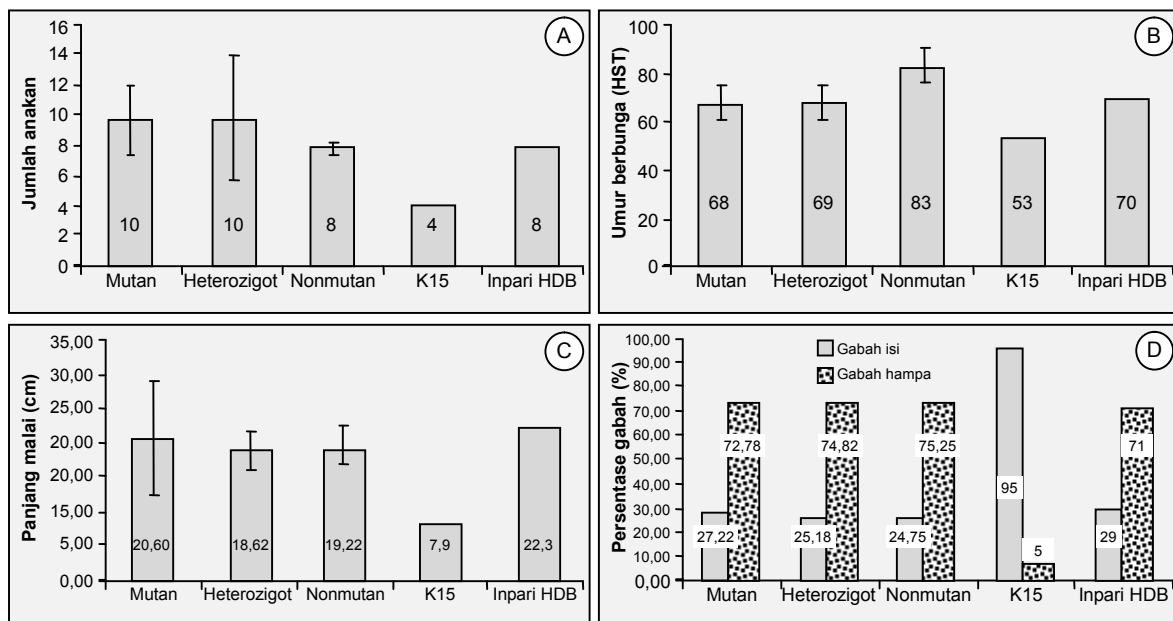
Gambar 3. Keragaan tinggi tanaman galur mutan, nonmutan, dan heterozigot dibandingkan dengan kedua tetuanya. (A) Rataan tinggi tanaman tiga kelompok galur F₂ Inpari HDB/K15 dan kedua tetuanya. (B) Keragaan tinggi tanaman galur F₂ Inpari HDB/K15 mutan dibandingkan dengan kedua tetuanya, K15 dan Inpari HDB. Inp HDB wt = varietas Inpari HDB tipe liar (*wild type*), K15 = tetua donor yang membawa gen *sd1* mutan.

memiliki jumlah anakan yang lebih banyak dibanding dengan galur F₂ nonmutan dan tetua Inpari HDB (Gambar 4A). Peningkatan jumlah anakan/tanaman galur F₂ mutan *semidwarf* kemungkinan disebabkan oleh adanya efek pleiotropik dari gen *sd1* mutan. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan sebelumnya (Tomita dan Ishii 2018) yang menunjukkan bahwa introgresi gen *sd1* mutan ke dalam genom padi Hikarishinseiki menghasilkan efek pleiotropik berupa jumlah anakan/tanaman yang lebih banyak.

Keragaan karakter umur berbunga galur F₂ Inpari HDB/K15 mutan hampir sama dengan tetua Inpari HDB (Gambar 4B). Hal ini menunjukkan bahwa gen *sd1* mutan pada galur mutan tersebut tidak memengaruhi umur berbunga. Terdapat dua enzim GA20 oksidase pada genom padi, yaitu GA20ox-1 dan GA20ox-2. GA20ox-1 hanya tereksresi pada bunga, sedangkan GA20ox-2 tereksresi pada daun dan bunga (Sasaki et al. 2002). Mutan *sd1* menghasilkan efek pleiotropik, namun tidak memengaruhi fertilitas dan pembentukan bunga. Hal ini terjadi karena sistem organ reproduksi tanaman dikendalikan oleh gen GA20 yang lain, yaitu GA20ox-1 sehingga mutasi yang terjadi pada GA20ox-2 dapat mengurangi tinggi tanaman, namun tidak memengaruhi fertilitas biji (Sasaki et al. 2002). Hasil analisis tinggi tanaman, jumlah anakan, dan umur berbunga galur-galur F₂ Inpari HDB/K15 pada penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya (Sasaki et al. 2002), yaitu

gen *sd1* mutan pada padi Inpari HDB/K15 tidak berpengaruh negatif terhadap umur berbunga.

Panjang malai merupakan salah satu karakter komponen hasil penting pada padi. Petani cenderung memilih varietas padi yang memiliki malai panjang dan lebat sebab malai yang panjang berpotensi menghasilkan gabah lebih banyak dibanding dengan malai yang pendek. Padi dengan malai yang lebih panjang mempunyai peluang lebih tinggi untuk meningkatkan produktivitas (Ashikari et al. 2005). Namun, malai yang panjang tidak selalu memberikan hasil yang tinggi sebab karakter hasil juga dipengaruhi oleh jumlah gabah isi dan hampa per malai. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rataan panjang malai galur F₂ Inpari HDB/K15 mutan lebih panjang dibanding dengan galur F₂ HDB/K15 heterozigot, galur nonmutan, dan K15 mutan. Nilai rataan panjang malai Inpari HDB paling panjang dibanding dengan kelompok lainnya, namun tidak berbeda jauh dengan panjang malai F₂ Inpari HDB/K15 mutan (Gambar 4C). Hal tersebut menunjukkan bahwa gen *sd1* mutan pada galur F₂ Inpari HDB/K15 mutan juga tidak memberikan pengaruh negatif terhadap karakter panjang malai. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya (Ogi et al. 1993; Murai et al. 2004; Tomita dan Ishii 2018) yang menunjukkan bahwa tanaman hasil persilangan galur isogenik yang membawa gen *sd1* dari padi *Dee-geo-woo-gen* dan IR8 dengan padi tipe liar, seperti Norin 29, Shiokari, dan Koshihikari, tidak menghasilkan malai yang lebih panjang.



Gambar 4. Perbandingan keragaan fenotipe beberapa karakter agronomi dan komponen hasil antara tiga kelompok galur F₂ Inpari HDB/K15 dan kedua tetuanya. (A) Karakter jumlah anakan/tanaman. (B) Karakter umur berbunga. (C) Karakter panjang malai. (D) Karakter persentase gabah isi dan gabah hampa. Inp HDB = varietas Inpari HDB, K15 = tetua donor yang membawa gen *sd1* mutan.

Pada penelitian ini, persentase gabah hampa pada galur padi F_2 Inpari HDB/K15 mutan cukup tinggi dengan rata-rata persentase gabah hampa 73,28%. Persentase tersebut tidak jauh berbeda dengan persentase gabah hampa Inpari HDB kontrol (Gambar 4D). Tingginya persentase gabah hampa pada galur F_2 Inpari HDB/K15 dan galur lain termasuk kontrol (kecuali pada tetua K15) diduga bukan dipengaruhi oleh adanya mutasi gen *sd1*. Tingginya persentase gabah hampa pada galur F_2 dan padi Inpari HDB lebih disebabkan oleh faktor lingkungan. Salah satu faktor lingkungan yang diduga memengaruhi tingginya persentase gabah hampa dan terjadi pada penelitian ini, yaitu adanya serangan hama walang sangit (*Leptocorisa oratorius* Fabricius) di rumah kaca. Walang sangit merupakan salah satu hama yang dapat mengurangi hasil panen dan menyerang tanaman padi pada fase pembungaan hingga fase matang susu. Hama ini menyerang padi dengan cara menusuk bulir padi dan menghisap cairannya sehingga bulir padi tidak berkembang sempurna dan menjadi hampa (Hosamani et al. 2009). Sementara itu, persentase gabah hampa padi K15 sangat rendah dibanding dengan galur F_2 dan tetua Inpari HDB. Meskipun persentase gabah hampa sangat rendah, jumlah total gabah per malai tetua K15 juga sangat rendah yaitu hanya 14 gabah per malai. Rendahnya persentase gabah hampa pada padi K15 diduga karena postur tanaman K15 yang kecil dengan tinggi tanaman hanya 37,5 cm. Hal ini diduga mengakibatkan tanaman tersebut terhindar dari serangan walang sangit.

Secara umum, penelitian telah berhasil menganalisis secara molekuler dan fenotipe introgresi gen *sd1* mutan pada galur F_2 hasil persilangan antara padi Inpari HDB dan K15 mutan. Penelitian telah menghasilkan galur-galur padi F_2 Inpari HDB/K15 yang membawa gen *sd1* mutan homozigot resesif dan mempunyai postur tanaman yang lebih pendek dibanding dengan tanaman kontrol Inpari HDB. Galur tersebut akan dievaluasi lebih lanjut untuk memperoleh galur yang mempunyai karakteristik seperti padi Inpari HDB, namun mempunyai postur *semidwarf*. Hasil penelitian ini memberikan implikasi bahwa perakitan padi dengan karakter yang diinginkan dapat dilakukan dengan kombinasi pendekatan pengeditan gen dan persilangan konvensional apabila memang ditemukan adanya kendala dalam regenerasi *in vitro* pada tanaman target. Teknologi pengeditan gen CRISPR/Cas9 dapat langsung menghasilkan tanaman mutan yang stabil dan tidak mengubah karakter-karakter yang lain kecuali karakter target apabila aplikasi teknologi transformasi genetik dan

regenerasi *in vitro* tanaman telah mapan dan mudah diaplikasikan.

KESIMPULAN

Analisis molekuler mengonfirmasi gen *sd1* mutan telah berhasil diintrogresikan ke dalam genom padi Inpari HDB melalui persilangan dengan tetua donor K15. Sebanyak sembilan galur F_2 Inpari HDB/K15 yang membawa alel gen mutan *sd1* diperoleh dalam kondisi homozigot resesif. Analisis fenotipe menunjukkan bahwa kesembilan galur F_2 Inpari HDB/K15 mutan memiliki postur *semidwarf*. Efek pleiotropik terlihat pada galur-galur mutan tersebut yang diindikasikan dengan jumlah anakan per tanaman yang lebih banyak dibanding dengan keragaan tetuanya. Galur F_2 Inpari HDB/K15 mutan ini perlu diverifikasi lebih lanjut dan galur yang potensial merupakan kandidat galur varietas Inpari HDB dengan postur tanaman *semidwarf*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai melalui DIPA BB Biogen TA 2018 dengan No. Kode DIPA 1798.101.002.053. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Nuryati atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian ini.

KONTRIBUTOR PENULISAN

CSAF: kontributor utama, melakukan penelitian, mengumpulkan data, menganalisis data, dan menulis manuskrip. S: kontributor utama, supervisi penelitian, interpretasi data, dan memfinalkan manuskrip. TJS: kontributor utama, desain dan ide penelitian, supervisi penelitian, analisis data, menulis manuskrip, dan memfinalkan manuskrip.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashikari, M., Sakakibara, H., Lin, S., Yamamoto, T., Takashi, T., Nishimura, A., Angeles, E.R., Qian, Q., Kitano, H. & Matsuoka, M. (2005) Plant science: Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*. [Online] 309 (5735), 741–745. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1113373> [Accessed 19 April 2017].
- Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G. & Carroll, D. (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161, 1169–1175 [Accessed 29 August 2019].
- Butler, N.M., Atkins, P.A., Voytas, D.F. & Douches, D.S. (2015) Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLOS One*. [Online] 10 (12),

- 1–12. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144591> [Accessed 29 September 2019].
- Char, S.N., Neelakandan, A.K., Nahampun, H., Frame, B., Main, M., Spalding, M.H., Becraft, P.W., Meyers, B.C., Walbot, V., Wang, K. & Yang, B. (2017) An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*. [Online] 15 (2), 257–268. Available from: <https://doi.org/10.1111/pbi.12611> [Accessed 21 March 2018].
- Chen, M., Zhao, Z., Chen, L., Zhou, F., Zhong, Z., Jiang, L. & Wan, J. (2013) Genetic analysis and fine mapping of a semi-dwarf gene in a centromeric region in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science*. [Online] 63 (2), 164–168. Available from: <https://doi.org/10.1270/jsbbs.63.164> [Accessed 29 September 2019].
- Dello, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P. & Sabatini, S. (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current Biology*. [Online] 17 (8), 678–682. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047> [Accessed 28 September 2019].
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M., Vogel, J. & Charpentier, E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. [Online] 471 (7340), 602–607. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature09886> [Accessed 21 March 2018].
- Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P. & Moineau, S. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*. [Online] 190 (4), 1390–1400. Available from: <https://doi.org/10.1128/JB.01412-07> [Accessed 28 March 2018].
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. [Online] 19 (1), 11–15. Available from: https://webpages.uncc.edu/~jweller2/pages/BINF8350f2011/BINF8350_Readings/Doyle_plantDNAextractCTAB_1987.pdf [Accessed 29 September 2018].
- Hirano, K., Ordonio, R.L. & Matsuoka, M. (2017) Engineering the lodging resistance mechanism of post-green revolution rice to meet future demands. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. [Online] 93 (4), 220–233. Available from: <https://doi.org/10.2183/pjab.93.014> [Accessed 29 September 2019].
- Hosamani, V., Pradeep, S., Sridhara, S. & Kalleshwaraswamy, C.M. (2009) Biological studies on paddy ear head bug, *Leptocoris oratorius* Fabricius (Hemiptera: Alydidae). *Academic Journal of Entomology*, 2 (2), 52–55.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. [Online] 337 (6096), 816–821. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1225829> [Accessed 21 March 2018].
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. [Online] 155 (3), 733–740. Available from: <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0> [Accessed 12 June 2015].
- Murai, M., Komazaki, T. & Sato, S. (2004) Effects of *sd1* and *Ur1* (*Undulate rachis-1*) on lodging resistance and related traits in rice. *Breeding Science*. [Online] 54 (4), 333–340. Available from: <https://doi.org/10.1270/jsbbs.54.333> [Accessed 6 July 2020].
- Ogi, Y., Kato, H., Maruyama, K. & Kikuchi, F. (1993) The effect on the culm length and other agronomic characters caused by semidwarfing genes at the *sd-1* locus in rice. *Japan Journal of Breeding*. [Online] 5743, 267–275. Available from: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/> [Accessed 6 July 2020].
- Okuno, A., Hirano, K., Asano, K., Takase, W., Masuda, R., Morinaka, Y., Ueguchi-Tanaka, M., Kitano, H. & Matsuoka, M. (2014) New approach to increasing rice lodging resistance and biomass yield through the use of high gibberellin producing varieties. *PLOS One*. [Online] 9 (2), 1–13. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086870> [Accessed 19 February 2020].
- Pan, C., Ye, L., Qin, L., Liu, X., He, Y., Wang, J., Chen, L. & Lu, G. (2016) CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Scientific Reports*. [Online] 6 (January), 1–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep24765> [Accessed 11 October 2018].
- Santoso, T.J., Enggarini, W., Trijatmiko, K.R. & Sitepu, M.B. (2016) *Introduksi konstruk CRISPR-Cas9/gen Ga20ox-2 ke padi dan identifikasi mutan-mutan padi melalui analisis molekuler dan sekuensing. Laporan Tahunan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian. Bogor, BB Biogen.*
- Sasaki, A., Ashikari, M., Ueguchi-Tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Swapan, D., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Khush, G.S., Kitano, H. & Matsuoka, M. (2002) A mutant gibberellin-synthesis gene in rice: New insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago. *Nature*. [Online] 416 (6882), 701–702. Available from: <https://doi.org/10.1038/416701a> [Accessed 21 October 2015].
- Sasmitha, P., Satoto, Guswara, A., Suharna, Rahmini & Handoko, D.D. (2019) *Deskripsi varietas unggul baru padi (Inbrida Padi Sawah Irigasi [INPARI], Hibrida Padi [HIPA], Inbrida Padi Gogo [INPAGO], Inbrida Padi Rawa [INPARA])*. [Online] Tersedia pada: <http://>

- bbpadi.litbang.pertanian.go.id/index.php/publikasi/buku/deskripsi-varietas-unggul-baru-padi-2019 [Diakses 7 Juli 2020].
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., Zhang, Y., Chen, K., Liang, Z., Zhang, K., Liu, J., Xi, J.J., Qiu, J.L. & Gao, C. (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. [Online] 31 (8), 686–688. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt.2650> [Accessed 21 October 2015].
- Spielmeyer, W., Ellis, M.H. & Chandler, P.M. (2002) Semidwarf (*sd-1*), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. [Online] 99 (13), 9043–9048. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.132266399> [Accessed 22 October 2015].
- Tomita, M. & Ishii, K. (2018) Genetic performance of the semidwarfing allele *sd1* derived from a *japonica* rice cultivar and minimum requirements to detect its single-nucleotide polymorphism by MiSeq whole-genome sequencing. *BioMed Research International*. [Online] 2018, 4241725. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/4241725> [Accessed 6 July 2020].
- Xu, T., Li, Y., Van Nostrand, J.D., He, Z. & Zhou, J. (2014) Cas9-based tools for targeted genome editing and transcriptional control. *Applied and Environmental Microbiology*. [Online] 80 (5), 1544–1552. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.03786-13> [Accessed 19 February 2020].
-