

# Optimasi Sistem Regenerasi dan Transformasi Padi Varietas Elit Indonesia

Aniversari Apriana\*, Toto Hadiarto, dan Ahmad Dadang

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111  
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: nanas\_setyawan@yahoo.com

Diajukan: 5 November 2012; Diterima: 12 Februari 2013

## ABSTRACT

**Optimization of Regeneration and Transformation System of Indonesian Elite Rice Variety. Aniversari Apriana, Toto Hadiarto, and Ahmad Dadang.** New rice variety can be generated by means of transgenic approach. Transgenic rice researches have been conducted in many institutions worldwide using *Japonica*, *Indica*, and *Javanica* varieties. The most cultivated rice in Indonesia is *Indica*. *Indica* type is known to have low responsive tissues in culture and transformation media when compared to *Japonica* rice. This research activity is aimed to optimize regeneration and transformation systems of the Indonesian elite rice varieties, so that good method can be achieved to be used in the generation of transgenic elite rice varieties of *Indica* type. The research consisted of two activities: regeneration and transformation optimizations in varieties of Dodokan (upland rice) and Inpari 6 (irrigated rice). Immature embryo was used as the explant in this research. The optimization studies used 2 types of media, NBH (N6 salts and vitamins, cassamino acid 0.5 g/l, L-proline 0.5 g/l, sucrose 20 g/l, D-glucose 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l, agarose Type I 5.5 g/l) and NBH-M (N6 macro salts, B5 micro salts, and vitamins, 0.3 g/l cassamino acid, 3 g/l L-proline, 20 g/l sucrose, 3 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 5.5 agarose Type I), 2 types of regeneration media, R1 (MS base media and vitamins, 0.3 g/l glutamine, 30 g/l sucrose, 2 mg/l kinetin, 1 mg/l NAA, 3 g/l phytigel) and R2 (MS base media and vitamins, 2 g/l cassamino acid, 20 g/l sucrose, 30 mg/l sorbitol, 2.5 mg/l kinetin, 0.25 mg/l NAA, 3 g/l phytigel). Optimization transformation of Indonesian elite rice varieties used developed an empty plasmid pCAMBIA 1301 containing *hpt* gene. The transformation was conducted using two types of co-cultivation media, K1 (N6 macro salts, B5 micro salts, and vitamins, 0.5 g/l cassamino acid, 0.5 g/l L-proline, 20 g/l sucrose, 10 g/l glucose, 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 0.1 mM acetosyringone) and K2 (N6 macro salts, B5 micro salts, and vitamins, 0.5 g/l cassamino acid, 0.5 g/l L-proline, 20 g/l sucrose, 10 g/l glucose, 2 mg/l 2,4-D, 1 mg/l NAA, 1 mg/l BAP, 0.2 mM acetosyringone). The results showed that Inpari 6 could form embryonic calli in NBH media and further regenerated well in R1 media (13.8%). The co-cultivation media K1 generated more selected calli which then generated green plant of young embryo compared to K2. Inpari 6 showed higher regeneration rates after transformation (3.6%) compared to Dodokan (0%). Molecular analysis showed that all 11 transformants (Inpari

6) tested contained the *hpt* gene. These results are expected to support the development of transgenic *Indica* rice generation in Indonesia.

**Keywords:** Rice, *Indica*, regeneration, transformation.

## ABSTRAK

**Optimasi Sistem Regenerasi dan Transformasi Padi Varietas Elit Indonesia. Aniversari Apriana, Toto Hadiarto, dan Ahmad Dadang.** Perakitan varietas baru padi dapat dilakukan melalui rekayasa genetik. Penelitian tentang perakitan tanaman padi transgenik telah banyak dilakukan baik pada tanaman padi kelompok *Japonica*, *Indica*, dan *Javanica*. Varietas padi yang banyak dibudidayakan di Indonesia adalah dari kelompok *Indica*. Penelitian pembentukan tanaman transgenik terhadap varietas elit Indonesia kelompok *Indica* perlu dilakukan. Kelompok padi *Indica* diketahui lebih rekalsitrasi dalam respon jaringannya terhadap media kultur dan transformasi dibandingkan dengan kelompok *Japonica*. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan optimasi regenerasi dan transformasi dari varietas padi elit Indonesia guna menunjang kegiatan pemuliaan tanaman padi, sehingga didapatkan suatu metode yang dapat digunakan dalam perakitan tanaman transgenik padi varietas elit Indonesia kelompok *Indica*. Penelitian ini terdiri dari 2 kegiatan, yaitu (1) Optimasi regenerasi dan (2) Optimasi sistem transformasi pada varietas padi elit Indonesia, yaitu Inpari 6 (padi sawah) dan Dodokan (padi gogo). Embrio muda padi digunakan sebagai eksplan dalam penelitian ini. Kegiatan optimasi regenerasi menggunakan 2 jenis media induksi kalus, yaitu NBH (garam dan vitamin N6, asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, D-glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l, agarosae tipe I 5,5 g/l, pH 5,8) dan NBH-M (garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin, asam cassamino 0,3 g/l, L-prolin 3 g/l, sukrosa 20 g/l, 2,4-D 3 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, agarosa tipe I 5,5, pH 5,8). Regenerasi menggunakan 2 macam media, yaitu R1 (media dasar dan vitamin MS, glutamin 0,3 g/l, sukrosa 30 g/l, kinetin 2 mg/l, NAA 1 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8) dan R2 (media dasar dan vitamin MS, asam cassamino 2 g/l, sukrosa 20 g/l, sorbitol 30 mg/l, kinetin 2,5 mg/l, NAA 0,25 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8). Kegiatan optimasi transformasi pada varietas padi elit Indonesia menggunakan plasmid pCAMBIA 1301 yang mengandung gen pelapor *hpt*. Kegiatan ini menggunakan 2 macam media ko-kultivasi K1 (garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin, asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, asetosiringon 0,1 mM) dan K2 (garam makro N6,

garam mikro B5, dan vitamin, asam cassamino 5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, asetosiringon 0,2 mM). Hasil penelitian menunjukkan bahwa varietas Inpari 6 dapat membentuk kalus embriogenik pada media NBH yang kemudian dapat beregenerasi dengan baik pada media R1 (13,8%). Media ko-kultivasi K1 lebih baik dalam menghasilkan jumlah kalus terseleksi yang akhirnya dapat beregenerasi membentuk tanaman hijau pada kalus embrio muda hasil transformasi. Inpari 6 mempunyai nilai efisiensi transformasi tertinggi, yaitu sebesar 3,6% bila dibandingkan dengan varietas Dodokan (0%). Analisis molekuler menunjukkan 11 transforman Inpari 6 yang dianalisis, semua mengandung gen *hpt*. Hasil penelitian ini akan membantu dalam pengembangan perakitan tanaman padi *Indica* transgenik di Indonesia.

**Kata kunci:** Padi, *Indica*, regenerasi, transformasi.

## PENDAHULUAN

Untuk menunjang peningkatan produksi beras nasional, perlu dirakit varietas padi baru yang memiliki produktivitas tinggi dari varietas elit Indonesia yang sudah ada. Varietas padi elit yang banyak ditanam di Indonesia adalah dari kelompok *Indica*. Perakitan varietas unggul padi baru dapat dilakukan melalui teknik rekayasa genetik yang akan membentuk tanaman transgenik. Tanaman transgenik padi dari kelompok padi *Indica* sangat diperlukan di Indonesia, namun demikian kelompok padi *Indica* diketahui lebih rekalsitran dalam respon jaringannya terhadap media kultur dan transformasi dibandingkan dengan kelompok *Japonica* (Cooley *et al.*, 1995). Penelitian tentang perakitan tanaman padi transgenik telah banyak dilakukan baik pada tanaman padi kelompok *Japonica*, *Indica* maupun *Javanica* (Slamet-Loedin *et al.*, 1997; Maftuchah *et al.*, 2000; Rachmawati *et al.*, 2004; Hiei dan Komari, 2006; Ishizaki dan Kumashiro, 2008).

Varietas padi elit Indonesia seperti Inpari 6, Inpari 1, Dodokan merupakan contoh varietas padi elit Indonesia. Varietas-varietas ini adalah hasil pemuliaan yang dilakukan oleh pemulia padi Indonesia dan telah banyak dikembangkan oleh para petani. Inpari 6 adalah varietas yang mempunyai keunggulan, di antaranya mempunyai potensi hasil tinggi, yaitu 12 t/ha, nasinya sangat pulen, tahan HDB dan wereng batang coklat. Varietas Dodokan adalah varietas padi sawah, namun dapat ditanam di lahan tadah hujan (gogo). Varietas ini mempunyai potensi hasil 5,1 t/ha, dan tahan hama wereng coklat (Suprihatno *et al.*, 2011).

Untuk mendapatkan tanaman transgenik yang diinginkan ada beberapa hal yang perlu dilakukan, di antaranya pemilihan gen yang digunakan, metode dan materi yang akan digunakan untuk transformasi, dan analisis transgen secara molekuler dan fenotipik se-

suai dengan karakter yang dituju. Gen-gen yang membawa sifat yang berpengaruh terhadap sifat-sifat yang diinginkan dapat diperoleh baik melalui informasi di bank gen maupun dari publikasi di jurnal ilmiah.

Metode transformasi yang digunakan dapat secara fisik (penembakan partikel, elektroporasi, PEG) atau biologis melalui bantuan *Agrobacterium*. Metode transformasi secara fisik bersifat acak, sehingga kemungkinan besar akan menghasilkan transforman dengan banyak jumlah kopi gen di dalam genom tanaman, namun tidak dibatasi pada penggunaan jenis materi maupun kelas tanaman yang akan digunakan untuk transformasi. Transformasi tanaman melalui *Agrobacterium* bersifat terarah, sehingga persentase diperolehnya transgen dengan jumlah kopi gen rendah di dalam genom tanaman lebih tinggi jika dibandingkan dengan transformasi menggunakan penembakan partikel. Penelitian transformasi padi menggunakan penembakan partikel telah dilakukan oleh Li *et al.* (1993) dan Maneewan *et al.* (2005). Sedangkan penelitian transformasi padi menggunakan bantuan *Agrobacterium* telah dilakukan pada padi kelompok *Japonica* maupun *Indica* untuk berbagai tujuan (Hiei dan Komari, 2006; Ishizaki dan Kumashiro, 2008; Saha *et al.*, 2006; Rashid *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 2001; Rachmawati *et al.*, 2004; Saharan *et al.*, 2004). Penelitian transformasi melalui *Agrobacterium* pada padi dari kelompok *Japonica* menunjukkan efisiensi transformasi lebih tinggi (10-20%) (Saika *et al.*, 2011; Apriana *et al.*, 2011) jika dibandingkan dengan transformasi padi dari kelompok *Indica*, varietas IR64 (2,5-10%) (Hiei dan Komari, 2006).

Materi yang akan ditransformasi harus mempunyai sifat kompeten regenerasi di media kultur dan kompeten transformasi. Hal ini sangat tergantung pada genotipe tanaman yang akan digunakan. Menurut Opabode (2006) berbagai faktor yang mempengaruhi keberhasilan transformasi adalah genotipe tanaman, strain *Agrobacterium*, vektor plasmid, senyawa penginduksi gen *vir*, komposisi medium yang digunakan untuk transformasi, dan suhu lingkungan. Senyawa penginduksi gen *vir* agar bereksresi di antaranya senyawa monosiklik fenolik, seperti asetosiringon, dan monosakarida, seperti glukosa dan galaktosa (Maftuchah *et al.*, 2000). Menurut Hiei dan Komari (2008) untuk tanaman yang rekalsitran, eksplan yang digunakan sebagai bahan transformasi akan lebih baik bila menggunakan embrio muda. Lebih lanjut Hiei dan Komari (2008) menyatakan bahwa faktor kunci keberhasilan transformasi adalah penggunaan eksplan embrio muda yang sehat secara langsung dan optimasi media kultur. Pengembangan media perlu dilakukan

karena antara genotipe satu dengan yang lain akan berbeda di dalam merespon suatu media.

Penelitian ini merupakan penelitian awal untuk mendapatkan kondisi optimal sistem regenerasi transformasi padi varietas elit Indonesia. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai metode acuan untuk perakitan tanaman padi transgenik varietas elit Indonesia (*Indica*).

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, BB Biogen. Penelitian dibagi dalam dua tahap, yaitu (1) optimasi sistem regenerasi padi varietas elit Indonesia dan (2) optimasi sistem transformasi padi varietas elit Indonesia.

### Optimasi Sistem Regenerasi Padi Varietas Elit Indonesia

#### Bahan tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2 varietas padi elit Indonesia, yaitu Inpari 6 dan Dodokan. Varietas Inpari 6 mempunyai potensi hasil tinggi sebesar 12 t/ha, nasinya sangat pulen, tahan HDB dan wereng batang coklat. Varietas Dodokan adalah varietas padi sawah, namun dapat ditanam di lahan tadah hujan (gogo). Varietas ini mempunyai potensi hasil 5,1 t/ha, dan tahan hama wereng coklat (Suprihatno *et al.*, 2011).

#### Persiapan materi

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio muda dari masing-masing varietas. Biji padi umur 8-12 hari setelah antesis digunakan sebagai sumber eksplan. Biji dikupas dan disterilisasi menggunakan 70% alkohol selama 10 detik dan dilanjutkan dengan merendamnya dalam 20% pemutih komersial selama 5 menit. Setelah itu dicuci dengan menggunakan akuades steril sebanyak 6 kali.

**Tabel 1.** Komposisi media induksi kalus.

Media	Komposisi
NBH	Garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg <i>et al.</i> , 1968), asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, agarosa tipe I 5,5, pH 5,8 (Hiei dan Komari, 2006).
NBH-M	Garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg <i>et al.</i> , 1968), asam cassamino 0,3 g/l, L-prolin 3 g/l, sukrosa 20 g/l, 2,4-D 3 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, agarosa tipe I 5,5, pH 5,8.

**Tabel 2.** Komposisi media regenerasi.

Media	Komposisi
Regenerasi R1	Media dasar dan vitamin MS, glutamin 0,3 g/l, sukrosa 30 g/l, kinetin 2 mg/l, NAA 1 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8.
Regenerasi R2	Media dasar dan vitamin MS, asam cassamino 2 g/l, sukrosa 20 g/l, sorbitol 30 mg/l, kinetin 2,5 mg/l, NAA 0,25 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8 (Ishizaki dan Kumashiro, 2008).

### Induksi dan regenerasi kalus

Embrio muda dari varietas Inpari 6 dan Dodokan ditanam pada media induksi kalus menurut metode Hiei dan Komari (2006). Media induksi kalus terdiri dari 2 jenis, yaitu NBH (Hiei dan Komari, 2006) dan NBH-M (modifikasi) (Tabel 1). Setelah 7 hari di media induksi kalus, embrio muda tersebut disubkultur ke media induksi kalus yang sama selama  $\pm 14$  hari dengan memotong tunas yang muncul dari setiap embrio. Kalus-kalus yang terbentuk kemudian ditanam di media regenerasi untuk menginduksi terbentuknya tunas mengacu pada metode Ishizaki dan Kumashiro (2008). Media regenerasi terdiri dari 2 jenis, yaitu R1 (modifikasi) dan R2 (Ishizaki dan Kumashiro, 2008) (Tabel 2).

Parameter yang diamati adalah morfologi kalus yang meliputi warna kalus (putih atau kekuningan), kepadatan kalus (kompak atau remah), persentase jumlah embrio muda yang dapat membentuk kalus pada media induksi kalus serta persentase jumlah kalus yang dapat membentuk spot hijau atau tunas di media regenerasi.

### Optimasi Sistem Transformasi Padi Varietas Elit Indonesia

Kegiatan penelitian optimasi transformasi mengacu pada metode yang telah dilakukan oleh Hiei dan Komari (2006), dengan menggunakan 2 macam media ko-kultivasi yaitu K1 dan K2.

#### Bahan

Materi genetik yang digunakan adalah varietas Inpari 6 dan Dodokan. Inpari 6 mewakili varietas padi sawah, sedangkan varietas Dodokan mewakili padi gogo. Plasmid yang digunakan dalam kegiatan ini adalah plasmid pCAMBIA 1301 yang mengandung gen penanda *hpt* dan *gus* yang dimasukkan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* strain Agl-1.

## Metode

### Persiapan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*.

*Agrobacterium tumefaciens* strain Agl-1::pCAMBIA1301 yang digunakan untuk transformasi berasal dari koloni tunggal yang ditumbuhkan selama 2-3 hari di media YEP cair yang mengandung antibiotik kanamisin 100 mg/l dan karbenisilin 75 mg/l. Dari suspensi bakteri tersebut kemudian diambil 500  $\mu$ l untuk ditumbuhkan pada media AB padat yang mengandung antibiotik kanamisin 100 mg/l dan karbenisilin 75 mg/l. Bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 3 hari dan siap digunakan untuk kegiatan transformasi. Sebelum digunakan untuk transformasi, bakteri dilarutkan dalam media AA infeksi (Tabel 3) dengan menambahkan asetosiringon sebanyak 100 mg/l. Kepadatan sel bakteri yang digunakan untuk transformasi diperkirakan mencapai  $OD_{600} = 1$  ( $3.5 \times 10^9$  sel/ml).

**Persiapan transformasi.** Embrio muda varietas Inpari 6 dan Dodokan berumur 8-12 hari setelah penyerbukan ditanam di media ko-kultivasi padat yang mengandung asetosiringon 100 mg/l. Metode transformasi mengacu pada metode Hiei dan Komari (2006). Komposisi media dapat dilihat pada Tabel 3.

**Transformasi embrio muda padi.** Embrio muda dari 2 varietas padi elit Indonesia Inpari 6 dan Dodokan yang ditanam di media ko-kultivasi padat kemudian direndam dalam media ko-kultivasi cair. Media ko-kultivasi cair terdiri dari bakteri *A. tumefaciens* strain Agl-1::pCAMBIA 1301 yang disuspensikan ke dalam media AA infeksi (Tabel 3) yang mengandung asetosiringon sebanyak 0,1 mM (K1) dan 0,2 mM (K2). Embrio muda padi direndam dalam suspensi bakteri dengan cara meneteskan 5  $\mu$ l media ko-kultivasi cair ke setiap embrio muda padi. Embrio dalam keadaan terendam pada suspensi bakteri ini diinkubasi selama 7 hari pada suhu 25°C di ruang gelap. Plasmid pCAMBIA 1301 tersebut mengandung gen *hptII* (gen yang menyandikan ketahanan terhadap antibiotik

higromisin) dan gen *gus* (gen yang menyandikan enzim  $\beta$ -glucuronidase). Tahap selanjutnya, embrio muda dipindahkan ke media resting (Tabel 3) yang mengandung antibiotik sefotaksim 300 mg/l dan vancomisin 100 mg/l selama 5 hari dengan memotong tunas yang tumbuh dari embrio tersebut. Embrio tersebut kemudian ditanam di media seleksi (Tabel 3) yang mengandung antibiotik sefotaksim 300 mg/l, vancomisin 100 mg/l, dan higromisin 20 mg/l selama 3 x 10 hari.

Embrio yang berhasil lolos di media seleksi (yang dapat tumbuh membentuk kalus) kemudian dipindahkan ke media preregenerasi (Tabel 3) selama 10 hari yang mengandung antibiotik sefotaksim 200 mg/l, vancomisin 100 mg/l, dan higromisin 20 mg/l. Kalus yang dapat tumbuh di media preregenerasi kemudian ditanam di media regenerasi (Tabel 3) yang mengandung antibiotik sefotaksim 100 mg/l, vancomisin 100 mg/l, dan higromisin 30 mg/l. Tunas yang tumbuh dari kalus kemudian dipindahkan ke media perakaran (Tabel 3) yang mengandung antibiotik sefotaksim 100 mg/l, vancomisin 100 mg/l, dan higromisin 40 mg/l. Parameter yang diamati adalah jumlah embrio muda yang ditransformasi, jumlah embrio yang lolos di media seleksi, jumlah kalus yang berhasil beregenerasi membentuk spot hijau/tunas, jumlah planlet, jumlah tanaman, serta jumlah galur independen yang berhasil diperoleh.

### Analisis molekuler tanaman putatif transgenik.

Analisis molekuler dengan PCR bertujuan untuk memastikan tanaman putatif transgenik yang berhasil tumbuh dari kalus embrio yang telah ditransformasi mengandung gen penanda *hpt* (Gandill *et al.*, 2001; Karthikeyan *et al.*, 2011). DNA genom diisolasi dari daun padi tanaman putatif transgenik dan non transgenik (sebagai kontrol) dengan metode miniprep (Shure *et al.*, 1983). Amplifikasi DNA tanaman putatif transgenik dan non transgenik dilakukan dengan mengguna-

**Tabel 3.** Komposisi media transformasi yang mengacu pada metode Hiei dan Komari (2006).

Media	Komposisi
NBH	Garam dan vitamin N6 (Chu, 1978), asam cassamino 0,5 g/l, L-proline 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, D-glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l, agarosae tipe I 5,5 g/l, pH 5,8.
AA infeksi (ko-kultivasi cair)	Garam dan asam amino AA (Toriyama dan Hinata, 1985), vitamin B5, asam cassamino 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, D-glukosa 10 g/l, pH 5,2.
N6As (ko-kultivasi padat)	Garam dan vitamin N6 (Chu, 1978), asam cassamino 0,5 g/l, L-proline 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, D-glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l, agarosae tipe I 5,5 g/l, pH 5,2.
NBM ( <i>resting</i> )	Garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg <i>et al.</i> , 1968), asam cassamino 0,5 g/l, L-proline 0,5 g/l, L-glutamine 0,3 g/l, D-maltose 20 g/l, D-manitol 36 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 0,2 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8.
NBMH30 (seleksi)	Media NBM, ditambah antibiotik yang sesuai.
NBPR (pre-regenerasi)	Garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg <i>et al.</i> , 1968), asam cassamino 0,5 g/l, L-proline 0,5 g/l, L-Glutamine 0,3 g/l, D-Maltose 30 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8.
RNM (regenerasi)	Garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg <i>et al.</i> , 1968), asam cassamino 0,5 g/l, L-proline 0,3 g/l, L-Glutamine 0,3 g/l, D-Maltose 30 g/l, NAA 1 mg/l, BA 3 mg/l, agarosae tipe I 4 g/l, pH 5,8.
R (perakaran)	Media dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962), sukrosa 30 g/l, IBA 0,2 mg/l, fitagel 2,5 g/l, pH 5,8.

kan primer spesifik untuk gen *hpt*, yaitu primer *forward*: 5'-GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG-3' dan primer *reverse*: 5'-GCATCTCCCGCCGTGCAC-3'. Sebanyak 15 µl produk PCR diseparasi dengan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1% (w/v), diwarnai dengan EtBr dan divisualisasi dengan sinar UV menggunakan instrumen *chemidoc*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Optimasi Sistem Regenerasi Padi Varietas Elit Indonesia

#### Induksi kalus

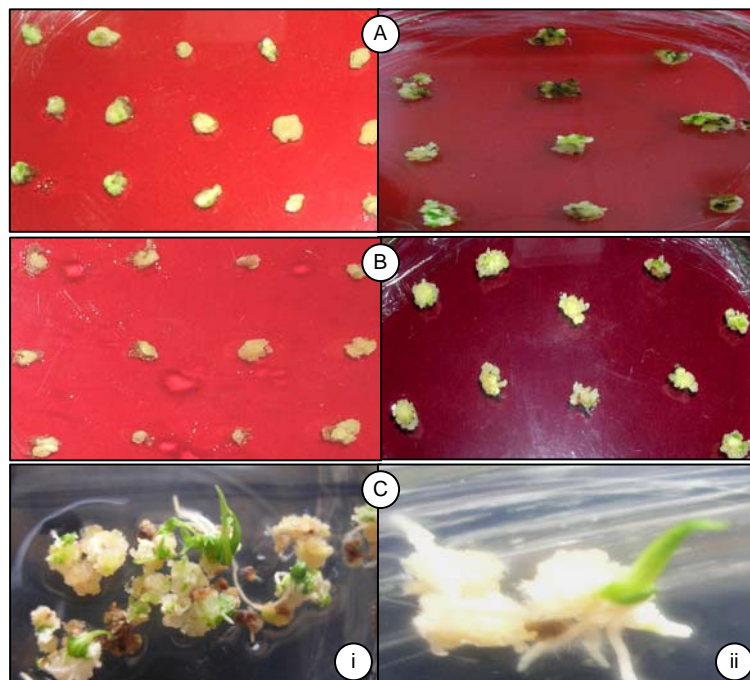
Kalus berhasil terbentuk dari skutelum embrio muda setelah diinduksi selama 5-7 hari baik pada media NBH maupun NBH-M (Tabel 4). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa keberhasilan terbentuknya kalus dari embrio muda dari 2 varietas padi yang ditanam pada media NBH persentasenya lebih tinggi dibandingkan dengan yang ditanam pada media NBH-M (Tabel 4). Namun demikian, ukuran kalus yang terbentuk dari eksplan yang ditanam pada media NBH-M relatif lebih besar dibandingkan dengan ukuran kalus dari eksplan yang di tanam pada media NBH (data tidak disajikan). Morfologi kalus yang terbentuk dari eksplan yang ditanam pada media NBH menunjukkan

bentuk kalus yang kompak, bulat, warna putih kekuningan, dan mengkilap (kalus embriogenik). Sedangkan kalus yang terbentuk dari eksplan yang ditanam pada media NBH-M menunjukkan bentuk kalus yang kompak, warna putih kekuningan, tetapi tidak mengkilap (Gambar 1).

Embrio setelah disubkultur ke media yang sama mampu membentuk spot hijau lebih banyak dibandingkan dengan embrio muda yang ditanam di media NBH-M. Komposisi media induksi kalus yang mengandung asam cassamino tinggi (0,5 g/l) dan prolin rendah (0,5 g/l) dengan penambahan hormon 2,4-D rendah (2 mg/l) pada media NBH dapat menginduksi kalus lebih baik dan mampu menginduksi spot hijau lebih banyak pada kalus yang terbentuk (Gambar 1). Persentase embrio muda dalam membentuk kalus di media NBH dari varietas Inpari 6 (93,2%) dan Dodokan (90,8%) lebih tinggi dibandingkan dengan embrio muda Inpari 6 (72,1%) dan Dodokan (86,2%) yang ditanam di media induksi kalus NBH-M (Tabel 4).

#### Regenerasi kalus

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kalus dari embrio muda varietas Dodokan baik yang berasal dari NBH maupun NBH-M belum berhasil membentuk tunas setelah dipindah/ditanam pada media regene-



**Gambar 1.** Optimasi sistem regenerasi dengan menggunakan kalus embrio muda pada media yang berbeda. A = hasil induksi kalus embrio muda Inpari 6 di media induksi kalus NBH dan setelah disubkultur di media yang sama, B = hasil induksi kalus embrio muda Inpari 6 di media induksi kalus NBH-M dan setelah disubkultur di media yang sama, C = tunas hasil regenerasi dari kalus embrio muda varietas Inpari 6 yang berasal dari media NBH di media R1 (i) dan R2 (ii).

rasi R1 maupun R2 (Tabel 5). Kalus-kalus Dodokan yang ditanam pada media R1 maupun R2 hanya mampu membentuk spot hijau saja. Varietas Dodokan secara umum menunjukkan persentase pembentukan kalus dengan spot hijau di media regenerasi R1 dan R2 lebih tinggi dibandingkan dengan varietas Inpari 6. Persentase pembentukan spot hijau di media regenerasi R1 dari kalus varietas Dodokan yang berasal dari media induksi kalus NBH sebesar 98,3% dan kalus yang berasal dari media induksi kalus NBH-M sebesar 91,2%. Sedangkan persentase kalus dengan spot hijau di media regenerasi R2 yang berasal dari media induksi kalus NBH sebesar 48,3% dan kalus yang berasal dari media induksi kalus NBH-M sebesar 40%. Namun demikian spot-spot hijau dari kalus varietas Dodokan tersebut tidak berhasil beregenerasi membentuk tunas.

Persentase pembentukan spot hijau dari kalus varietas Inpari 6 meskipun lebih rendah dari varietas Dodokan, tetapi mampu membentuk tunas pada media regenerasi R1 maupun R2. Kalus-kalus dengan spot hijau yang mampu beregenerasi membentuk tunas hanya kalus yang berasal dari media induksi kalus NBH. Sedangkan kalus yang berasal dari media NBH-M pada varietas ini belum berhasil membentuk tunas di media regenerasi R1 maupun R2. Persentase terbentuknya tunas dari kalus yang ditanam pada media R1

(13,8%) lebih tinggi dibandingkan dengan persentase terbentuknya tunas dari kalus yang ditanam pada media R2 (3,9%) (Tabel 5 dan Gambar 1).

Secara umum, apabila dilihat dari persentase keberhasilan kalus membentuk spot hijau dari kedua varietas yang digunakan pada media regenerasi R1 maupun R2, kalus yang ditanam pada media regenerasi R1 lebih banyak membentuk spot hijau bila dibandingkan dengan kalus yang ditanam pada media regenerasi R2 (Tabel 5). Apabila dilihat dari asal kalus pada jenis media induksi kalus, kalus yang berasal dari media NBH lebih tinggi persentasenya membentuk spot hijau di media regenerasi R1 maupun R2 bila dibandingkan dengan kalus yang berasal dari NBH-M.

Dari komposisi media induksi kalus NBH dan NBH-M, dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan konsentrasi asam cassamino, L-prolin, dan hormon 2,4-D antara kedua media tersebut. Hal ini mengindikasikan bahwa asam cassamino dan/atau L-prolin serta hormon 2,4-D berpengaruh dalam menginduksi kalus embriogenik. Menurut Ishizaki dan Kumashiro (2008), asam cassamino merupakan salah satu sumber asam amino yang sangat baik untuk pertumbuhan kalus asam cassamino memiliki seluruh komponen asam amino esensial kecuali triptofan sebagai sumber nitrogen. Di sisi lain, L-prolin tidak mempengaruhi pembentukan kalus embriogenik secara signifikan

**Tabel 4.** Jumlah dan deskripsi kalus dari 2 genotipe padi elit Indonesia yang ditumbuhkan pada 2 jenis media induksi kalus NBH dan NBH-M.

Media induksi kalus	Varietas	Jumlah eksplan	Jumlah kalus (%)	Deskripsi
NBH	Dodokan	130	118 (90,8)	Kalus kompak, warna putih kekuningan, mengkilap
	Inpari 6	117	109 (93,2)	
NBH-M	Dodokan	130	112 (86,2)	Kalus kompak, warna putih kekuningan, ukuran relatif lebih besar bila dibandingkan dengan kalus di media NBH
	Inpari 6	122	88 (72,1)	

Angka di dalam kurung menunjukkan persentase kalus yang terbentuk dari jumlah eksplan awal (embrio belum masak padi). NBH = garam dan vitamin N6 (Chu, 1978), asam cassamino 0,5 g/l, L-proline 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, D-glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l, agarosae tipe I 5,5 g/l, pH 5,8; NBH-M = garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg *et al.*, 1968), asam cassamino 0,3 g/l, L-prolin 3 g/l, sukrosa 20 g/l, 2,4-D 3 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, agarosa tipe I 5,5, pH 5,8.

**Tabel 5.** Jumlah kalus, jumlah kalus dengan spot hijau, dan jumlah kalus yang beregenerasi pada 2 jenis media regenerasi R1 dan R2.

Varietas	Media induksi kalus	Media regenerasi	Jumlah kalus	Jumlah kalus spot hijau (%)	Jumlah kalus beregenerasi (%)	Jumlah tanaman hijau
Dodokan	NBH	R1	59	58 (98,3)	0	0
		R2	58	28 (48,3)	0	0
	NBH-M	R1	57	52 (91,2)	0	0
		R2	55	22 (40)	0	0
Inpari 6	NBH	R1	58	46 (79,3)	8 (13,8)	11
		R2	51	31 (60,8)	2 (3,9)	2
	NBH-M	R1	46	34 (73,9)	0	0
		R2	42	16 (38,1)	0	0

Angka di dalam kurung menunjukkan persentase kalus yang dapat membentuk spot hijau dan beregenerasi menjadi tunas terhadap jumlah kalus yang ditumbuhkan di media induksi kalus. NBH = garam dan vitamin N6 (Chu, 1978), asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, D-glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l, agarosae tipe I 5,5 g/l, pH 5,8; NBH-M = garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg *et al.*, 1968), asam cassamino 0,3 g/l, L-prolin 3 g/l, sukrosa 20 g/l, 2,4-D 3 mg/l, NAA 1 mg/l, 1 mg/l BAP, agarosa tipe I 5,5, pH 5,8. R1 = media dasar dan vitamin MS, glutamin 0,3 g/l, sukrosa 30 g/l, kinetin 2 mg/l, NAA 1 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8. R2 = media dasar dan vitamin MS, asam cassamino 2 g/l, sukrosa 20 g/l, sorbitol 30 mg/l, kinetin 2,5 mg/l, NAA 0,25 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8.

(Buiteveld *et al.*, 1994). Konsentrasi hormon 2,4-D yang digunakan secara tepat juga akan mempengaruhi kualitas kalus yang terbentuk.

Perbedaan kemampuan regenerasi dari kalus varietas Inpari 6 yang cukup besar pada media R1 (13,8%) dan R2 (3,9%) tentunya dipengaruhi oleh perbedaan pada komposisi kedua media tersebut. Perbedaan antara media R1 dan R2 terdapat pada komponen glutamin pada media R1 atau asam cassamino dan sorbitol pada media R2. Selain itu, media R1 memiliki konsentrasi sukrosa dan NAA yang lebih tinggi dibandingkan dengan media R2, sedangkan R2 memiliki konsentrasi kinetin yang lebih tinggi. Pengaruh dari masing-masing komponen pada media tidak berdiri sendiri, namun saling berkaitan (Chandler dan Vasil, 1984; Vasil dan Vasil 1985). Salah satu komponen penting dalam media ini adalah NAA. NAA pada media R1 memiliki konsentrasi 1 mg/l sedangkan pada media R2 sebesar 0,25 mg/l. Sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Tariq *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa NAA dengan konsentrasi 1 mg/l memberikan frekuensi regenerasi padi yang paling tinggi.

Varietas Inpari 6 secara umum lebih baik dalam membentuk kalus maupun tunas bila dibandingkan dengan varietas Dodokan. Kalus varietas Inpari 6 yang berhasil membentuk spot hijau di media regenerasi (R1 dan R2) jumlahnya lebih sedikit dibandingkan dengan kalus varietas Dodokan, namun demikian spot hijau dari kalus tersebut mampu beregenerasi membentuk tunas. Hal ini menunjukkan bahwa kalus yang berasal dari embrio muda varietas Inpari 6 lebih cocok terhadap media yang digunakan dalam kegiatan optimasi regenerasi bila dibandingkan dengan varietas Dodokan.

Media NBH (Hiei dan Komari, 2006) relatif lebih baik dalam pembentukan kalus yang embriogenik dibandingkan dengan media NBH-M. Media regenerasi R1 lebih baik dalam menginduksi tunas bila dibandingkan dengan media R2 (mengacu pada metode Ishizaki dan Khumasiro, 2008). Varietas Inpari 6 lebih kompeten dalam membentuk tunas pada media regenerasi bila dibandingkan dengan Dodokan.

### Optimasi Sistem Transformasi Padi Varietas Elit Indonesia

#### Ko-kultivasi

Dua varietas padi elit, yaitu Inpari 6 dan Dodokan diko-kultivasi pada media K1 dan K2. Embrio muda yang ditransformasi menggunakan media ko-kultivasi K1 lebih tinggi persentasenya dalam menghasilkan kalus yang lolos di media seleksi dibandingkan dengan embrio muda yang ditransformasi menggunakan me-

dia ko-kultivasi K2 (Tabel 6). Persentase kalus embrio muda yang dapat lolos di media seleksi yang berasal dari media ko-kultivasi K1 dari varietas Inpari 6 sebesar 88,8% dan Dodokan sebesar 83%. Sedangkan persentase kalus embrio muda yang dapat lolos di media seleksi yang berasal dari media ko-kultivasi K2 dari varietas Inpari 6 sebesar 39%, sedangkan Dodokan sebesar 42,2%.

Kalus-kalus embrio muda varietas Inpari 6 dan Dodokan hasil transformasi yang menggunakan media ko-kultivasi K1 juga lebih tinggi persentasenya dalam menginduksi pembentukan spot hijau. Kalus embrio muda dari varietas Inpari 6 berhasil membentuk spot hijau tertinggi dengan persentase 11,8%. Kalus dengan spot hijau tersebut mampu tumbuh beregenerasi menjadi tunas di media regenerasi.

Secara umum, kalus hasil transformasi yang ditumbuhkan di media ko-kultivasi K1 lebih tinggi persentasenya dalam pembentukan spot hijau dan tunas (baik di media regenerasi R1 maupun R2) bila dibandingkan dengan kalus yang berasal dari media ko-kultivasi K2 (Tabel 6 dan Gambar 2). Media ko-kultivasi K1 dan K2 mengandung asetosiringon dengan konsentrasi yang berbeda. Meskipun asetosiringon dapat meningkatkan efisiensi transformasi (Sheikholeslam dan Weeks, 1987), namun dengan menaikkan konsentrasinya dari 0,1 mM (K1) menjadi 0,2 mM (K2) semakin menurunkan kemampuan regenerasi kalus. Senyawa asetosiringon ini akan menginduksi gen *vir* yang berada di dalam Ti-plasmid bakteri untuk mentransfer gen yang ada di bagian T-DNA dari plasmid tersebut ke dalam genom tanaman. Dari studi yang dilakukan oleh Karthikeyan *et al.* (2011), diketahui bahwa konsentrasi asetosiringon sebesar 0,1 mM merupakan konsentrasi optimum pada transformasi padi tipe *Indica*.

#### Regenerasi

Pada tahap regenerasi, telah berhasil diperoleh transforman padi varietas Inpari 6 (Tabel 6 dan Gambar 2). Kalus Inpari 6 hasil transformasi yang ditumbuhkan di media ko-kultivasi K1 lebih tinggi persentasenya dalam membentuk tunas di media regenerasi bila dibandingkan dengan kalus hasil transformasi yang menggunakan media ko-kultivasi K2. Konsentrasi asetosiringon sebanyak 0,1 mM sudah cukup membantu bakteri menginfeksi kalus padi, sehingga mampu bertahan di media seleksi dan dapat beregenerasi membentuk tunas. Dari hasil optimasi transformasi tersebut berhasil diperoleh 13 transforman varietas Inpari 6, yang terdiri dari 10 transforman berasal dari embrio muda yang ditumbuhkan di media ko-kultivasi K1 dan



3 transforman berasal dari embrio muda yang ditumbuhkan di media ko-kultivasi K2.

Seperti hasil pada kegiatan optimasi regenerasi, kalus dari varietas Dodokan hanya mampu menghasilkan spot hijau saja di media regenerasi dan spot hijau tersebut tidak mampu beregenerasi membentuk tunas (Tabel 6). Kalus embrio muda varietas Inpari 6 yang mampu menghasilkan spot hijau dengan persentase sebanyak 11,8% mampu berkembang menjadi tunas di media regenerasi. Kalus-kalus yang dapat beregenerasi menjadi tunas tersebut berasal dari embrio muda yang di tanam di media ko-kultivasi dengan penambahan asetosiringon sebanyak 0,1 mM (K1) maupun 0,2 mM (K2). Kalus yang berasal dari media ko-kultivasi dengan penambahan asetosiringon sebanyak 0,1 mM lebih tinggi menghasilkan tunas (3,6%) jika dibandingkan dengan kalus yang berasal dari media dengan

penambahan asetosiringon sebanyak 0,2 mM (0,65%). Hasil tersebut dapat dikatakan bahwa nilai efisiensi transformasi varietas Inpari 6 yang berasal dari media ko-kultivasi K1 sebesar 3,6%, sedangkan yang berasal dari media ko-kultivasi K2 nilai efisiensi transformasinya lebih rendah, yaitu 0,65%. Dari hasil ini varietas Inpari 6 merupakan varietas yang lebih cocok ditransformasi dibandingkan dengan varietas Dodokan (berdasarkan metode transformasi yang digunakan).

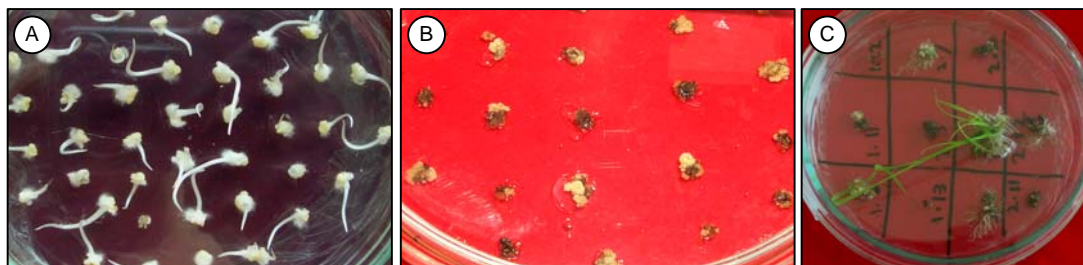
### Analisis molekuler

Hasil dari analisis molekuler dari 11 transforman Inpari 6 putatif transgenik generasi  $T_0$  (9 transforman berasal dari media ko-kultivasi K1 dan 2 transforman berasal dari media ko-kultivasi K2) dapat dilihat pada Gambar 3.

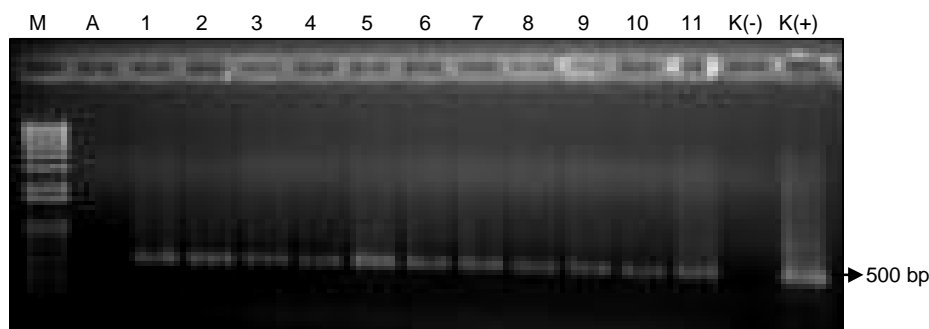
**Tabel 6.** Hasil transformasi embrio muda padi varietas Dodokan dan Inpari 6 dengan menggunakan 2 jenis media ko-kultivasi K1 dan K2.

Media ko-kultivasi	Varietas	Jumlah eksplan	Jumlah kalus lolos seleksi	Jumlah kalus di media regenerasi	Jumlah kalus spot hijau	Jumlah kalus yang beregenerasi	Jumlah transforman
K1	Inpari 6	170	151 (88,8)	32 (18,8)	20 (11,8)	6 (3,6)	10
	Dodokan	241	200 (83)	14 (5,8)	8 (3,3)	0	0
K2	Inpari 6	306	120 (39,2)	27 (8,8)	11 (3,6)	2 (0,65)	3
	Dodokan	218	92 (42,2)	15 (6,9)	0	0	0

Angka dalam kurung menunjukkan persentase, yang masing-masing dihitung terhadap jumlah eksplan. K1 = garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg *et al.*, 1968), asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, asetosiringon 0,1 mM. K2 = garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin (Gamborg *et al.*, 1968), asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, asetosiringon 0,2 mM.



**Gambar 2.** Perkembangan kalus embrio muda Inpari 6 pada tahapan transformasi. A = embrio muda di media ko-kultivasi K1, B = kalus di media seleksi (kalus yang tumbuh berwarna putih adalah kalus yang tahan di media seleksi), C = kalus di media regenerasi yang berhasil berkembang menjadi tunas.



**Gambar 3.** Analisis molekuler pada 11 tanaman padi Inpari 6 transgenik generasi  $T_0$ . M = marker, A = air, 1-11 = DNA sampel, K(-) = kontrol negatif (DNA) tanaman non transgenik, K(+) = kontrol positif (plasmid pCAMBIA-1301).



Hasil uji molekuler yang dilakukan terhadap 11 tanaman T<sub>0</sub> hasil transformasi menunjukkan bahwa semua tanaman yang diuji mengandung gen penanda *hpt* yang ditunjukkan dengan terbentuknya amplikon dengan ukuran 500 bp. Gen *hpt* berada di bagian T-DNA yang telah berhasil ditransfer ke tanaman dengan bantuan *A. tumefaciens*, sehingga dari 11 tanaman transgenik yang diuji telah mengandung gen *hpt*. Dengan demikian, metode transformasi dan seleksi yang telah dilakukan dapat digunakan sebagai acuan untuk transformasi padi *Indica*.

### KESIMPULAN

Kegiatan optimasi sistem regenerasi padi varietas elit Indonesia menunjukkan media NBH (garam dan vitamin N6, asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, D-glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BA 1 mg/l, agarosa tipe I 5,5 g/l, pH 5,8) lebih baik dalam menginduksi kalus embriogenik dibandingkan dengan media NBH-M (garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin, asam cassamino 0,3 g/l, L-prolin 3 g/l, sukrosa 20 g/l, 2,4-D 3 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, agarosa tipe I 5,5, pH 5,8). Media regenerasi R1 (media dasar dan vitamin MS, glutamin 0,3 g/l, sukrosa 30 g/l, kinetin 2 mg/l, NAA 1 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8) lebih baik dalam menginduksi tunas dibandingkan dengan media R2 (media dasar dan vitamin MS, asam cassamino 2 g/l, sukrosa 20 g/l, sorbitol 30 mg/l, kinetin 2,5 mg/l, NAA 0,25 mg/l, fitagel 3 g/l, pH 5,8).

Kegiatan optimasi sistem transformasi menunjukkan media ko-kultivasi K1 (garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin, asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, asetosiringon 0,1 mM) yang mengandung asetosiringon 0,1 mM lebih baik untuk transformasi padi varietas Inpari 6, jika dibandingkan dengan transformasi menggunakan media ko-kultivasi K2 (garam makro N6, garam mikro B5, dan vitamin, asam cassamino 0,5 g/l, L-prolin 0,5 g/l, sukrosa 20 g/l, glukosa 10 g/l, 2,4-D 2 mg/l, NAA 1 mg/l, BAP 1 mg/l, asetosiringon 0,2 mM). Varietas Inpari 6 mempunyai efisiensi transformasi sebesar 3,6% dan Dodokan (0%). Hasil uji molekuler semua transforman Inpari 6 yang dianalisis (11 transforman) mengandung gen *hpt*. Hasil penelitian ini akan bermanfaat dalam pengembangan perakitan padi *Indica* transgenik di Indonesia.

### DAFTAR PUSTAKA

- Apriana, A., A. Sisharmini, W. Enggarini, Sudarsono, N. Khumaida, dan K.R. Trijatmiko. 2011. Introduksi konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman padi Nipponbare. *J. AgroBiogen* 7(1):19-27.
- Buiteveld, J., P.F. Fransz, and J. Creemers-Molenaar. 1994. Induction and characterization of embryonic callus types for the initiation of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). *Plant Sci.* 100:195-202.
- Chandler, S.F. and I.K. Vasil. 1984 Optimization of plant regeneration from long term embryonic callus cultures of *Pennisetum purpureum* Schum (Napier grass). *J. Plant Physiol.* 117:147-156.
- Cheng X., R. Sardana, H. Kaplan, and I. Altosaar. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *PNAS.* 95:2767-2771.
- Chu, C.C. 1978. The N6 medium and its application to anther culture of cereal crops. *Proceedings of the Symposium on Plant Tissue Culture.* Science Press, Peking. p. 43-50.
- Cooley, J., T. Ford, and P. Christou. 1995. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plant produced by electric discharge particle acceleration. *Theor. Appl. Genet.* 90:97-104.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.
- Gandill, R., S.C. Matheshwari, J.P. Khurana, and P. Khurana. 2001. Genetic and molecular analysis of *Arabidopsis thaliana* (ecotype 'Estland') transformed with *Agrobacterium*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 37:629-637.
- Hiei, Y. and T. Komari. 2006. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 85:271-283.
- Hiei, Y. and T. Komari. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols* 3:824-834.
- Ishizaki, T. and T. Kumashiro. 2008. Genetic transformation of NERICA, interspecific hybrid rice between *Oryza glaberrima* and *O. sativa*, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell. Rep.* 27:319-327.
- Karthikeyan, A., S.K. Pandian, and M. Ramesh. 2011. *Agrobacterium*-mediated transformation of leaf base derived callus tissues of popular indica rice (*Oryza sativa* L. sub sp. Indica cv. ADT 43). *Plant Sci.* 181:258-268.
- Li, L., R. Qu, A. de Kochko, C. Fauquet, and R.N. Beachy. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell. Rep.* 12:350-255.
- Maftuchah, I.H., Slamet-Loedin, dan H. Aswidinnor. 2000. Pengujian berbagai metode transformasi pada padi Cisadane melalui *Agrobacterium tumefaciens*. *Prosiding*

- Seminar Nasional Bioteknologi Pertanian. Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia.
- Maneewan, K., S. Bunnag, P. Theerakulpisut, M. Kosittrakun, and A. Suwanagul. 2005. Transformation of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Chainat 1 using chitinase gene. *J. Sci. Technol.* 27(6):1151-116.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Opabode, J.T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plant: Emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1(1):12-20.
- Qiu, H.J., Z.M. Wei, H.L. An, and Y.X. Zhu. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of rice with the spider insecticidal gene conferring resistance to leaf folder and striped stem borer. *Cell Res.* 11:149-155.
- Rachmawati, D., T. Hosaka, E. Inoue, and H. Anzai. 2004. *Agrobacterium*-mediated transformation of Javanica rice cv. Rojolele. *Biosci. Biochem. Technol.* 68(6):1193-1200.
- Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, and K. Hinata. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell. Rep.* 15:727-730.
- Saha, P., M. Prajay, D. Indrajit, R. Tui, S.C. Roy, and D. Sampa. 2006. Transgenic rice expressing *Allium sativum* leaf lectin with enhanced resistance against sap-sucking insect pests. *Planta.* DOI 10.1007/s00425-005-0182-z.
- Saharan, V., R.C. Yadav, N.R. Yadav, and K. Ram. 2004. Studies on improved *Agrobacterium* mediated transformation in two Indica rice (*Oryza sativa* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 3(11):572-575.
- Saika, H., W. Sakamoto, M. Maekawa, and S. Toki. 2011. Highly efficient visual selection of transgenic rice plants using green fluorescent protein or anthocyanin synthetic genes. *Plant Biotechnol.* 28:107-110.
- Sheikholeslam, S.N. and D.P. Weeks. 1987. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 8:291-298.
- Shure, M., S. Wessler, and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35:225-233.
- Slamet-Loedin, I.H., J.L. Wibowo, S. Hutaulu, dan W. Rahayu. 1997. Penggunaan dua strain *Agrobacterium tumefaciens* super virulen untuk ko kultivasi tanaman padi kultivar Cisadane dan Rojolele. Prosiding Kongres I dan Seminar Ilmiah PBPI. Surabaya.
- Suprihatno, B., A.A. Daradjat, Satoto, Suwarno, E. Lubis, Baehaki, Sudir, S.D. Indrasari, I.P. Wardana, dan M.J. Mejaya. 2011. Deskripsi Varietas Padi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian. hlm. 6 dan 49.
- Tariq, M., G. Ali, F. Hadi, S. Ahmad, N. Ali, and A.A. Shah. 2008. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) under various conditions. *Pak J. Biol. Sci.* 11:255-259.
- Toriyama, K. and K. Hinata. 1985. Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Sci.* 41:179-183.
- Vasil, V. dan I.K. Vasil. 1985 Plant regeneration from friable embryogenic callus and cell suspension cultures of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 124:399-408.
-