

Regenerasi dan Aklimatisasi Kultur Antera Enam Persilangan F1 Padi Sawah

Plantlet Regeneration and Acclimatization in Rice Anther Culture of 6 F1s

Cucu Gunarsih^{1,2}, Bambang Sapta Purwoko^{3*}, Iswari Saraswati Dewi⁴, dan Muhamad Syukur³

¹Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Jl Raya 9 Sukamandi, Subang, Indonesia

²Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

³Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

⁴Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetika Pertanian
Jl. Tentara Pelajar No. 3 A, Bogor, Indonesia

Diterima 29 Desember 2014/Disetujui 25 Agustus 2015

ABSTRACT

The breeding of rainfed rice tolerant to drought can be accomplished using anther culture. The objectives of this research were to determine regeneration abilities of six F1 anther culture and its acclimatization ability. The experiment was arranged in completely randomized design with 14 replications. The treatments consisted of six F1 derived from crossing: INPARI 18 x IR83140-B-11-B (G1), INPARI 18 x B12825E-TB-1-25 (G2), INPARI 18 x IR87705-14-11-B-SKI-12 (G3), INPARI 22 x IR83140-B-11-B (G4), Bio-R81 x O18b-1 (G5), Bio-R82-2 x O18b-1 (G6). Media for callus induction was based on N6 medium + 2.0 mg L⁻¹ NAA + 0.5 mg L⁻¹ kinetin + 1.0 mM putresin + 60 g L⁻¹ sucrosa, media for regeneration was based on MS + 0.5 mg L⁻¹ NAA + 2.0 mg L⁻¹ kinetin + 1.0 mM putresin, and media for rooting was based on MS + 0.5 mg L⁻¹ IBA + 30 g L⁻¹ sucrosa. The result indicated that all six F1 had different ability in anther culture. Bio-R82-2 x O18b-1 (G6) and Bio-R81 x O18b-1 (G5) F1 genotype had good response both of callus induction and plant regeneration. These two F1 genotypes also gave the highest ratio of green planlet production to number of anther inoculated (GP:AI) were 5.50% and 4.65%, respectively. In this research, there were identified doubled haploid plants were developed from 4 F1 derived cross namely G2 (2 plants), G3 (4 plants), G5 (21 plants), and G6 (26 plants).

Keywords: Callus induction, doubled haploid, rice

ABSTRAK

Pembentukan tanaman dihaploid padi sawah tada hujan yang memiliki toleransi terhadap kekeringan dapat dilakukan dengan menggunakan kultur antera. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui respon daya regenerasi kultur antera enam asal persilangan (F1) dan kemampuan aklimatisasinya. Kultur antera dilakukan di rumah kaca BB Biogen dan Laboratorium Kultur Jaringan BB Biogen pada bulan Oktober 2013 sampai Juni 2014. Percobaan dilaksanakan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 14 ulangan. Pengujian dilakukan terhadap enam asal persilangan (F1) yaitu : INPARI 18 x IR83140-B-11-B (G1), INPARI 18 x B12825E-TB-1-25 (G2), INPARI 18 x IR87705-14-11-B-SKI-12 (G3), INPARI 22 x IR83140-B-11-B (G4), Bio-R81 x O18b-1 (G5), Bio-R82-2 x O18b-1 (G6). Media induksi kalus adalah media N6 + 2.0 mg L⁻¹ NAA + 0.5 mg L⁻¹ kinetin + 1.0 mM putresin + 60 g L⁻¹ sukrosa, media regenerasi kalus adalah media MS + 0.5 mg L⁻¹ NAA + 2.0 mg L⁻¹ kinetin + 1.0 mM putresin + 40 g L⁻¹ sukrosa. Media perakaran adalah media MS + 0.5 mg L⁻¹ IBA + 30 g L⁻¹ sukrosa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keenam asal persilangan (F1) memberikan respon yang bervariasi terhadap kultur antera padi. Asal persilangan G6 dan G5 menghasilkan respon induksi kalus dan regenerasi tanaman paling baik. Kedua asal persilangan tersebut juga memberikan efisiensi pembentukan tanaman hijau (TH:JA) lebih tinggi dibandingkan keempat asal persilangan lainnya, yaitu 5.50% dan 4.65%. Teridentifikasi dari 6 asal persilangan hanya 4 asal persilangan yang menghasilkan tanaman dihaploid, yaitu G1 (2 tanaman), G2 (4 tanaman), G5 (21 tanaman), dan G6 (26 tanaman).

Kata kunci: Dihaploid, induksi kalus, padi

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: bambangpurwoko@gmail.com

PENDAHULUAN

Kekeringan merupakan salah satu faktor utama yang berkontribusi terhadap rendahnya dan tidak stabilnya produksi padi sawah tada hujan di wilayah Asia (Pandey dan Bhandari, 2008). Diperkirakan sekitar 23 juta Ha lahan sawah (20% dari luas total lahan sawah) di Asia mengalami kekeringan dengan intensitas yang berbeda-beda. Perakitan padi sawah tada hujan yang toleran kekeringan serta memiliki hasil tinggi merupakan salah satu solusi untuk mengatasi kendala dalam peningkatan produktivitas padi. Salah satu caranya dengan memanfaatkan tetua donor yang toleran kekeringan yang disilangkan dengan tetua yang memiliki potensi hasil tinggi (Atlin *et al.*, 2006; Bernier *et al.*, 2008; Babu, 2010). Upaya lainnya dengan melakukan seleksi genotipe padi yang adaptif dan toleran kekeringan (Serraj *et al.*, 2011). Selain itu, rekayasa genetika dapat membantu pemulia dalam perakitan varietas padi yang toleran kekeringan. Diantaranya yaitu dengan penyisipan Gen *OsDREB1A* pada tanaman padi untuk regenerasi sifat toleran kekeringan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi kalus yang berasal dari 469 biji padi varietas Nipponbare menghasilkan 103 tanaman padi putative transgenik. Seluruh tanaman putatif transgenik padi yang diperoleh mengandung gen *OsDREB1A* berdasarkan hasil analisis molekuler dengan teknik PCR (Santosa *et al.*, 2011).

Pembentukan varietas unggul padi sawah tada hujan yang toleran kekeringan secara konvensional memerlukan waktu yang relatif lama, karena harus melakukan seleksi pada populasi bersegregasi selama beberapa generasi. Galur murni dengan sifat-sifat yang unggul dapat diperoleh pada waktu lebih dari 5 tahun. Teknik kultur antera dilaporkan dapat mempercepat perolehan galur-galur murni karena galur murni dihaploid (DH) yang homozigot dapat segera diperoleh pada generasi pertama (Basu *et al.*, 2011). Dengan demikian, pemanfaatan kultur antera dapat meningkatkan efisiensi proses seleksi, serta menghemat biaya, waktu dan tenaga kerja (Dewi dan Purwoko, 2012). Teknik ini telah banyak dimanfaatkan oleh para peneliti padi dengan berbagai macam tujuan, antara lain untuk mendapatkan galur-galur toleran naungan (Sasmita *et al.*, 2006), galur-galur toleran aluminium (Dewi *et al.*, 2009), perakitan tetua padi hibrida (Lestari dan Nugraha, 2006), perakitan padi tipe baru melalui seleksi silang berulang dan kultur anter (Abdullah *et al.*, 2008) dan pembentukan padi gogo dengan sifat-sifat tipe baru (Herawati *et al.*, 2008; Safitri *et al.*, 2010; Purbokurniawan *et al.*, 2014). Untuk memperoleh galur murni dihaploid dengan keragaman genetik yang luas maka kultur antera dilakukan menggunakan tanaman dengan heterozigositas tinggi, yaitu populasi generasi pertama (F1) dan kedua (F2) (Dewi dan Purwoko, 2001).

Umumnya tanaman haploid pada kultur antera padi diperoleh melalui dua tahap, yaitu tahap induksi butir tepung sari menjadi kalus (*embrioid*), dan tahap diferensiasi menjadi tanaman kecil (*plantlet*) (Dewi dan Purwoko, 2001). Keberhasilan kultur antera masih dibatasi oleh beberapa faktor, yaitu genotipe tanaman, komposisi media,

praperlakuan antera sebelum dikulturkan, fase pembentukan mikrospora pada saat antera dikulturkan, kondisi lingkungan tanaman yang akan diambil anteranya dan fase pengambilan malai (Lee *et al.*, 2004; Kaushal *et al.*, 2014). Kaushal *et al.* (2014) melaporkan bahwa genotipe, suhu saat praperlakuan, durasi praperlakuan dan interaksinya menunjukkan pengaruh yang nyata pada induksi kalus dan regenerasi tanaman hijau. Bagheri dan Jelodar (2008) menunjukkan bahwa faktor genetik sangat mempengaruhi proses kultur antera, baik dalam induksi kalus maupun regenerasi tanaman hijau karena keduanya diwariskan secara kuantitatif.

Penampilan fenotipik tanaman padi dapat dibedakan antara haploid dengan dihaploid pada generasi awal (DH0). Secara umum tanaman haploid lebih pendek, mempunyai banyak anakan, daun lebih pendek dan sempit, bulir gabah yang lebih kecil dan hampa (steril) serta tidak mempunyai ligula dan aurikel (Safitri *et al.*, 2010). Fertilitas tanaman haploid dapat diperbaiki menjadi dihaploid melalui penggandaan kromosom secara spontan, melalui induksi dengan pemangkasan (ratun) dan pemberian perlakuan kolkisin 0.1-0.3 % (Dewi *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2008).

Produksi tanaman haploid salah satunya ditentukan oleh regenerasi tanaman dari kalus atau embrioid dan persentase tanaman hijau yang dihasilkan (Zhou, 1996). Penelitian dilakukan untuk mengetahui respon daya regenerasi enam genotipe padi hasil kultur antera dan kemampuan aklimatisasinya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor pada bulan Oktober 2013 sampai dengan Juni 2014.

Bahan yang digunakan adalah eksplan antera (kepala sari) dari 6 genotipe F1 hasil persilangan VUB padi sawah; galur hasil kultur antera (Bio-R81 dan Bio-R82-2); dengan galur-galur padi sawah tada hujan (IR83140-B-11-B, B12825E-TB-1-25, IR87705-14-11-B-SKI-12); galur padi gogo (O18b-1) dengan kombinasi persilangan sebagai berikut : INPARI 18 x B12825E-TB-1-25 (G1), INPARI 18 x IR87705-14-11-B-SKI-12 (G2), INPARI 18 x IR83140-B-11-B (G3), INPARI 22 x IR83140-B-11-B (G4), Bio-R81 x O18b-1 (G5), dan Bio-R82-2 x O18b-1 (G6). Media induksi kalus adalah media N6 yang ditambahkan 2.0 mg L⁻¹ NAA dan 0.5 mg L⁻¹ kinetin, sedangkan media regenerasi kalus adalah media MS yang ditambahkan 0.5 mg L⁻¹ NAA dan 2.0 mg L⁻¹ kinetin. Putresin 10⁻³ M dan sukrosa berturut-turut sebanyak 60 g L⁻¹ dan 40 g L⁻¹ ditambahkan ke dalam media induksi kalus dan media regenerasi. Media perakaran adalah media MS + 0.5 mg L⁻¹ IBA + 30 g L⁻¹ sukrosa.

Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan 14 ulangan. Setiap ulangan merupakan satu cawan petri yang berisi antera dari 25-30 spikelet (bulir bunga) padi dari satu tanaman yang berasal dari satu genotipe F1. Pelaksanaan kultur antera mengikuti metode Dewi *et al.* (2004). Antera diambil dari malai yang masih terselubung pada saat fase bunting dengan jarak aurikel daun

bendera dengan aurikel daun di bawahnya 7-10 cm. Malai tersebut dicuci bersih kemudian dibungkus dengan kertas tissue yang telah dibasahi. Selanjutnya malai disimpan dalam ruang dingin bersuhu 5 °C selama 7-10 hari. Spikelet (bulir bunga) berasal dari bagian tengah atas malai yang telah dibuka selubungnya. Spikelet yang terpilih disterilkan dengan 20% NaOCl selama 20 menit dan dicuci dengan air steril sebanyak dua kali.

Spikelet-spikelet yang sudah steril dipotong seperti bagian dari pangkal dan dikumpulkan dalam cawan petri yang steril. Potongan spikelet tersebut diketuk-ketukkan menggunakan pinset pada cawan petri yang berisi 25 mL media induksi kalus, sampai antera keluar dan jatuh di atas media. Antera diinkubasi dalam ruang gelap bersuhu 25 ± 2 °C yang bertujuan untuk menginduksi keluarnya kalus yang berasal dari butir sari di dalam antera. Kalus biasanya muncul sekitar 3-4 minggu setelah inokulasi. Kalus yang memiliki tekstur kompak berukuran 1-2 mm dipindahkan ke dalam botol yang berisi 25 mL media regenerasi untuk merangsang keluarnya tunas. Tanaman hijau (planlet) yang tumbuh mencapai 3-5 cm pada media regenerasi dipindahkan ke tabung kultur yang berisi 15 mL media perakaran kultur antera. Akar yang telah tumbuh di media regenerasi, sebaiknya dipotong sedikit untuk merangsang pertumbuhan perakaran baru. Kultur ditempatkan dalam kondisi terang (cahaya 1600-1800 lux) dengan suhu 25 ± 2 °C selama 16 jam per hari.

Planlet hasil kultur antera diaklimatisasi dalam tabung reaksi berisi air steril selama ± 1 minggu dan diletakkan di tempat yang terkena cahaya matahari secara tidak langsung. Selanjutnya tanaman dipindahkan ke dalam bak semai berisi tanah berlumpur selama 1 minggu. Tanaman diperlakukan pada kondisi cahaya dengan intensitas yang secara bertahap meningkat selama proses aklimatisasi. Hal ini bertujuan supaya tanaman mampu beradaptasi dengan kondisi lapangan. Bibit padi hasil kultur antera dipindahkan dari bak ke pot di rumah kaca dan dipelihara sampai tanaman dewasa. Teknik pemilihan tanaman yang dihaploid yaitu penampilan tanaman normal, fertil, bernes, tidak bersegregasi dan homogen (Dewi dan Purwoko, 2012).

Pengamatan dilakukan terhadap jumlah antera dalam petri, jumlah antera menghasilkan kalus, jumlah kalus yang terbentuk, jumlah kalus yang menghasilkan tanaman, jumlah tanaman hijau, jumlah tanaman albino, dan jumlah galur dihaploid yang dihasilkan. Data primer yang diperoleh digunakan untuk mendapatkan persentase antera yang membentuk kalus, persentase kalus terhadap jumlah antera yang diinokulasi (untuk menghitung efisiensi pembentukan kalus), persentase tanaman hijau terhadap jumlah total tanaman, persentase tanaman albino terhadap jumlah total tanaman dan efisiensi setiap perlakuan dalam menghasilkan tanaman hijau yaitu persentase tanaman hijau terhadap jumlah antera yang diinokulasi. Data dianalisis dengan menggunakan sidik ragam, jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan DMRT pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Respon Persilangan Padi terhadap Induksi Pembentukan Kalus dan Regenerasi Tanaman

Hasil penelitian menunjukkan bahwa respon pembentukan kalus dari enam asal persilangan membutuhkan waktu lebih lama dan tidak serentak, yaitu lebih dari 7 minggu. Umumnya pembentukan kalus pertama pada media berkisar 3-8 minggu setelah antera ditanam (Dewi dan Purwoko, 2008; Safitri *et al.*, 2010). Pengamatan secara visual menunjukkan bahwa antera yang ditanam pada media tidak seluruhnya dapat diinduksi membentuk kalus. Hal ini sejalan dengan penelitian Sasmita *et al.* (2002) yang melaporkan bahwa antera yang tanggap terhadap perlakuan induksi kalus adalah antera yang tetap berwarna putih kekuningan, tetapi antera yang tidak berhasil mengeluarkan kalus akan berwarna cokelat kehitaman dan mati.

Asal persilangan (F1) G5 dan G6 mampu menghasilkan kalus (JK) terbanyak (36.1 butir kalus dan 26.5 butir kalus) dibandingkan dengan empat asal persilangan lainnya. Asal persilangan (F1) G4 menghasilkan kalus paling sedikit (3.2 butir kalus) (Tabel 1). Semua genotipe yang diuji menghasilkan kalus dengan jumlah kalus yang bervariasi

Tabel 1. Hasil induksi kalus dari enam genotipe F1 padi sawah hasil kultur antera

Asal Persilangan (F1)	JK	JKMT	JKMTH	JKMTA	KTT* (%)	KTH* (%)	KTA* (%)
INPARI 18 x IR83140-B-11-B (G1)	10.2c	2.6b	0.3b	2.3a	25.18	2.80	22.38
INPARI 18 x B12825E-TB-1-25 (G2)	4.0c	0.2c	0.1b	0.1b	5.36	1.79	3.57
INPARI 18 x IR87705-14-11-B-SKI-12 (G3)	3.4c	0.9c	0.2b	0.7b	27.08	6.25	20.83
INPARI 22 x IR83140-B-11-B (G4)	3.2c	0.7c	0.4b	0.4b	22.22	11.11	11.11
Bio-R81 x O18-b1 (G5)	26.5b	3.9a	1.7a	2.1a	14.56	6.47	8.09
Bio-R82-2 x O18-b1 (G6)	36.1a	4.4a	1.7a	2.7a	12.28	4.75	7.52

Keterangan: JK = jumlah kalus; JKMT = jumlah kalus yang menghasilkan tanaman (hijau dan albino); JKMTH = jumlah kalus yang menghasilkan tanaman hijau; JKMTA = jumlah kalus yang menghasilkan tanaman hijau dan albino; KTT = persentase kalus menghasilkan tanaman hijau; KTH = persentase kalus yang menghasilkan tanaman albino, *tidak diuji statistik. Data ditransformasi menggunakan akar kuadrat. Angka dalam satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada taraf α 5%

tergantung dari daya tanggap mikrospora dalam antera yang dikulturkan (Dewi *et al.*, 2009). Sasmita *et al.* (2002) melaporkan bahwa dari hasil penelitiannya, jumlah kalus yang dihasilkan pada kultur antera padi gogo F1 berkisar 22.0-55.0 butir kalus. Rendahnya jumlah kalus yang terbentuk pada beberapa galur tersebut, disebabkan tidak semua mikrospora dalam antera dapat diinduksi menjadi kalus. Hasil yang sama terjadi pada penelitian Safitri *et al.* (2010), dimana jumlah kalus yang dihasilkan dari beberapa persilangan padi gogo dan tipe baru dengan kisaran 28.1-112.2 butir kalus. Keberhasilan perlakuan induksi kalus dari penelitian Safitri *et al.* (2010), disebabkan latar belakang genetik sebagian tetua padi termasuk subspecies *japonica*. Sementara itu, keenam asal persilangan (F1) yang digunakan pada penelitian ini termasuk ke dalam subspecies *indica* yang kurang responsif dalam kultur antera dibandingkan subspecies *japonica*.

Perbedaan respon kultur antera antara tetua *indica* dan *japonica* juga mempengaruhi respon F1 hasil persilangannya (Herath dan Bandara, 2011). Grewal, *et al.* (2011) melaporkan bahwa kultivar *indica* menunjukkan daya kultur antera lebih rendah (persentase pembentukan kalus hanya mencapai 1.2%) dibandingkan tetua *japonica* yang mencapai 20 kali lipat lebih tinggi (28.1%). Genotipe F1 yang melibatkan tetua *japonica* dan *indica* menunjukkan daya kultur antera lebih tinggi dibandingkan F1 yang hanya melibatkan tetua *indica* saja. Kaushal *et al.* (2014) telah menguji 13 genotipe padi dengan perlakuan suhu rendah pada beberapa level suhu dan durasi. Respon terbaik pada penelitian tersebut ditunjukkan pada perlakuan 12 °C selama 5 hari yang dapat memberikan frekuensi terbentuknya kalus 10.07-30.44%.

Kalus yang beregenerasi membentuk tanaman hijau, tanaman albino bahkan tidak menghasilkan tanaman sama sekali. Sejalan dengan penelitian Sasmita *et al.* (2002) bahwa kalus embriogenik yang berwarna hijau beregenerasi menjadi tanaman hijau, sedangkan kalus yang berwarna putih bening beregenerasi menjadi tanaman albino. Hanya sedikit kalus yang beregenerasi menjadi tanaman hijau dan tanaman albino. Asal persilangan (F1) G6 dan G5 memberikan rata-rata jumlah kalus yang menghasilkan tanaman hijau paling banyak yaitu 1.7 butir kalus (Tabel 1).

Zhou (1996) mengungkapkan bahwa di antara genotipe bahkan subspecies terdapat perbedaan yang nyata dalam kemampuan regenerasi menjadi tanaman hijau. Dewi *et al.* (2009) melaporkan bahwa genotipe tanaman donor memegang peranan penting dalam keberhasilan membentuk tanaman hijau pada kultur antera padi. Subspecies *indica* dilaporkan memiliki daya kultur antera yang rendah.

Latar belakang genetik dari keenam asal persilangan (F1) yang digunakan pada penelitian kultur antera ini termasuk subspecies *indica*. Padi subspecies ini merupakan genotipe rekalsiran (genotipe yang tidak menghasilkan tanaman hijau) yang sulit menghasilkan regenerasi tanaman hijau, sedangkan *japonica* merupakan genotipe padi yang dikategorikan memiliki *high culturability*, yaitu genotipe yang mudah menghasilkan tanaman hijau (Chung, 1992). Hal-hal lainnya yang menyebabkan sulitnya *indica*

menghasilkan regenerasi tanaman hijau yaitu nekrosis antera yang lebih awal, rendahnya proliferasi kalus, tingkat senesen yang tinggi, serta respon androgenesis yang rendah (Datta, 2005).

Persentase kalus menghasilkan tanaman hijau (KTH) ditunjukkan oleh tiga asal persilangan (F1) yaitu G4, G5 dan G6 masing-masing sebesar 11.11%, 6.47%, dan 6.25% lebih tinggi dibandingkan dengan tiga asal persilangan lainnya. Namun, G4 menghasilkan jumlah kalus (JK) yang terendah dibandingkan G5 dan G6. Asal persilangan (F1) G4 dan G3 memberikan persentase tertinggi untuk jumlah kalus menghasilkan tanaman albino (KTA) dibandingkan dengan empat asal persilangan lainnya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai persentase kalus yang menghasilkan tanaman albino secara umum lebih tinggi (3.57-22.38%) dibandingkan nilai persentase kalus yang menghasilkan tanaman hijau (1.79-11.11%). Frekuensi kejadian tanaman albino yang tinggi dipengaruhi oleh genotipe yang dikulturkan (Chen, 1983; Chung, 1992). Zhou (1996) melaporkan bahwa tanaman albino mirip secara fenotipik dengan tanaman hijau, namun tanaman albino defisiensi kandungan klorofil, disebabkan plastid yang tidak berkembang menjadi kloroplas dan tidak terjadinya sintesis klorofil.

Pada penelitian ini, setiap asal persilangan (F1) menghasilkan jumlah tanaman yang bervariasi, baik jumlah tanaman hijau maupun tanaman albino (Tabel 2). Jumlah tanaman hijau paling banyak dihasilkan oleh asal persilangan G6 dan G5 yaitu 7.7 tanaman (40.30%) dan 7.3 tanaman (44.16%). Jumlah tanaman yang dihasilkan dari kedua asal persilangan tersebut berbeda nyata lebih tinggi dibandingkan dengan keempat asal persilangan lainnya. Kisaran nilai persentase jumlah tanaman hijau yang diperoleh pada penelitian ini untuk padi *indica* relatif lebih baik (6.85-55.52%), jika dibandingkan dengan hasil penelitian He *et al.* (2006). Hasil penelitiannya melaporkan bahwa dari tujuh varietas *indica* yang diuji, dihasilkan frekuensi pembentukan kalus yang bervariasi antara 3.6-51.7%, sementara efisiensi regenerasi tanaman hijau berkisar antara 1.6-82.9%. Hal ini mengindikasikan bahwa asal persilangan G6 dan G5 yang diuji pada penelitian ini memiliki daya kultur antera yang cukup tinggi.

Tanaman albino paling banyak dihasilkan oleh tiga asal persilangan yaitu G6, G5, dan G4 berturut-turut 11.4 tanaman (59.70%), 9.7 tanaman (93.14%), dan 9.2 tanaman (55.84%). (Tabel 2). Persentase tanaman albino tertinggi dicapai oleh asal persilangan G4 yaitu sebesar 93.14%, diikuti oleh asal persilangan G3 yaitu sebesar 88.90%. Kisaran nilai persentase jumlah tanaman albino yang diperoleh pada penelitian ini untuk padi *indica* sangat tinggi (44.43-93.14%). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Talebi *et al.* (2007) yang melaporkan bahwa pada kultivar padi *indica* cenderung menghasilkan frekuensi tanaman albino lebih besar dibandingkan varietas *japonica* yang berkisar antara 5-100%.

Pembentukan tanaman albino dapat ditekan dengan penggunaan poliamin, diantaranya pemberian 10^{-3} M Putresin (Dewi *et al.*, 2004; Dewi dan Purwoko, 2012), Beberapa

Tabel 2. Regenerasi tanaman dari enam genotipe F1 padi sawah hasil kultur antera

Genotipe F1	Jumlah tanaman			Tanaman hijau* (%)	Tanaman albino* (%)
	Hijau + Albino	Hijau	Albino		
INPARI 18 x IR83140-B-11-B (G1)	10.4b	0.7b	9.7a	6.85	93.14
INPARI 18 x B12825E-TB-1-25 (G2)	0.9c	0.2b	0.6c	24.97	75.03
INPARI 18 x IR87705-14-11-B-SKI-12 (G3)	3.9c	0.4b	3.4bc	11.12	88.90
INPARI 22 x IR83140-B-11-B (G4)	1.9c	1.1b	0.9c	55.52	44.43
Bio-R81 x O18-b1 (G5)	16.5ab	7.3a	9.2ab	44.16	55.84
Bio-R82-2 x O18-b1 (G6)	19.1ab	7.7a	11.4a	40.30	59.70

Keterangan: *tidak diuji statistik. Data ditransformasi menggunakan akar kuadrat. Angka dalam satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada taraf α 5%

strategi lain untuk meningkatkan perolehan tanaman hijau pada kultur antera subspecies *indica*, di antaranya adalah perbaikan latar belakang genetik melalui rekombinasi atau transfer gen, memanipulasi komponen media kultur terutama nitrogen dan sumber karbon, serta penyesuaian kondisi sebelum dan setelah kultur antera (Cha-Um *et al.*, 2009 ; da Silva, 2010).

Efisiensi Pembentukan Kalus dan Tanaman Hijau

Efisiensi pembentukan kalus untuk setiap asal persilangan (F1) yang dikulturkan dapat dihitung berdasarkan persentase jumlah kalus terbentuk terhadap jumlah antera yang ditanam. Efisiensi pembentukan kalus (EPK) paling tinggi dihasilkan oleh asal persilangan G6 dan G5, berturut-turut sebesar 25.70% dan 16.91%. Persentase (EPK) terendah dicapai oleh asal persilangan G4 yaitu sebesar 2.13% (Tabel 3). Asal persilangan G6 dan G5 jelas lebih efisien dalam pembentukan kalusnya karena keduanya memiliki daya kultur antera yang cukup tinggi.

Kalus yang terbentuk dalam kultur antera hanya sebagian yang menghasilkan tanaman. Persentase kalus yang menghasilkan tanaman (KTT) tertinggi dicapai oleh asal persilangan G2 (27.08%), G3 (25.18%) dan G4 (22.22%), namun rasio tanaman hijau terhadap kalus menghasilkan tanaman (ratio TH:KMT) hanya sebesar 0.46, 0.28, dan

1.50. Persentase tanaman hijau yang dihasilkan dari jumlah antera (EPTH) ketiga asal persilangan tersebut juga hanya sebesar 0.29, 0.50, dan 0.71. Penelitian Dewi *et al.* (2006) melaporkan bahwa regenerasi tanaman pada kultur antera beberapa aksesi padi *indica* toleran aluminium dipengaruhi oleh perbedaan genotipe yang diuji.

Asal persilangan G6 dan G5 menunjukkan persen kalus yang menghasilkan tanaman (KTT) sebesar 12.28% dan 14.56% (Tabel 3), tetapi rasio tanaman hijau terhadap kalus menghasilkan tanaman (ratio TH:KMT) masing-masing 1.74 dan 1.89, serta persentase tanaman hijau terhadap jumlah antera yang diinokulasikan (TH:JA) masing-masing sebesar 5.50 dan 4.65%. Rasio TH:KMT dan TH:JA yang dimiliki kedua asal persilangan ini paling tinggi, sehingga dalam menghasilkan tanaman hijaupun lebih banyak dibandingkan dengan keempat asal persilangan lainnya.

Aklimatisasi dan Tanaman Dihaploid

Jumlah tanaman dari 6 asal persilangan yang berhasil diaklimatisasi sebanyak 247 tanaman, sedangkan tanaman yang berhasil hidup sebanyak 156 tanaman (63.16%) setelah 2-3 minggu diaklimatisasi (Tabel 4). Jumlah tanaman tertinggi yang berhasil diaklimatisasi diperoleh dari asal persilangan G6 dan G5 masing-masing sebanyak 108 tanaman dan 102 tanaman (Tabel 4). Pada variabel jumlah

Tabel 3. Efisiensi pembentukan kalus dan tanaman hijau pada kultur antera padi

Genotipe F1	Jumlah antera (JA)	Efisiensi pembentukan kalus (%)	KTT (%)	Rasio TH terhadap KMT	Efisiensi pembentukan TH:JA (%)
INPARI 18 x IR83140-B-11-B (G1)	143.3	7.13	25.18	0.28	0.50
INPARI 18 x B12825E-TB-1-25 (G2)	140.2	2.85	5.36	1.00	0.15
INPARI 18 x IR87705-14-11-B-SKI-12 (G3)	146.2	2.35	27.08	0.46	0.29
INPARI 22 x IR83140-B-11-B (4)	150.9	2.13	22.22	1.50	0.71
Bio-R81 x O18-b1 (G5)	156.7	16.91	14.56	1.89	4.65
Bio-R82-2 x O18-b1 (G6)	140.4	25.70	12.28	1.74	5.50

Keterangan: KTT = persentase kalus menghasilkan tanaman hijau dan albino; KMT = kalus yang menghasilkan tanaman; TH = tanaman hijau

Tabel 4. Hasil aklimatisasi dan tanaman dihaploid yang dihasilkan dari kultur antera padi

Genotipe F1	Aklimatisasi	Jumlah tanaman hijau			
		Hidup	Dihaploid	Hidup (%)	Dihaploid (%)
INPARI 18 x IR83140-B-11-B (G1)	6	4	0	66.67	0.00
INPARI 18 x B12825E-TB-1-25 (G2)	3	2	2	66.67	100.00
INPARI 18 x IR87705-14-11-B-SKI-12 (G3)	5	4	4	80.00	100.00
INPARI 22 x IR83140-B-11-B (G4)	23	19	0	82.61	0.00
Bio-R81 x O18-b1 (G5)	102	51	21	50.00	41.18
Bio-R82-2 x O18-b1 (G6)	108	76	26	70.37	34.21
Total	247	156	53	63.16	33.97

tanaman yang hidup, asal persilangan G6 memberikan jumlah tanaman hidup paling banyak sebanyak 76 tanaman dan G5 menghasilkan tanaman hijau yang hidup sebanyak 51 tanaman. Asal persilangan G4 memberikan nilai persentase keberhasilan aklimatisasi tertinggi, yaitu 82.61%, diikuti oleh G2, G6, G5 masing-masing sebesar 80.00%, 70.37% dan 50.00%. Perbedaan kemampuan aklimatisasi antara asal persilangan ditentukan oleh ketegaran tanaman dan sistem perakaran yang terbentuk selama proses regenerasi dan perakaran. Tingginya persentase keberhasilan aklimatisasi asal persilangan G4 dan G2 disebabkan tahap sebelumnya yaitu tahap regenerasi. Keduanya memberikan persentase kalus menghasilkan tanaman hijau dan persentase jumlah tanaman hijau lebih tinggi, dengan jumlah regenerasi tanaman hijau yang sedikit sehingga kompetisi antar regenerasi tanaman hijau lebih rendah. Hal ini menyebabkan pertumbuhan dan ketegaran tanaman lebih baik.

Tanaman padi haploid dan dihaploid dapat dibedakan melalui fenotipik, diantaranya melalui bentuk tanaman (*stature*), warna daun, bentuk daun, perkembangan anakan dan akar, pembentukan biji, serta jumlah dan ukuran stomata (Dewi dan Purwoko, 2011). Tanaman yang dihaploid diseleksi melalui penampilan tanaman padi yang normal, memiliki malai yang fertil dan beras, tidak bersegregasi dan homogen (Dewi dan Purwoko, 2012).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa telah teridentifikasi sebanyak 53 tanaman (33.97%) yang terseleksi sebagai tanaman dihaploid. Dari keenam asal persilangan yang diuji hanya empat asal persilangan yang menghasilkan tanaman dihaploid, yaitu G1 (2 tanaman), G2 (4 tanaman), G5 (21 tanaman), dan G6 (26 tanaman). Safitri *et al.* (2010) melaporkan bahwa rendahnya jumlah tanaman dihaploid yang diperoleh pada penelitiannya disebabkan oleh faktor genetik dan rendahnya keberhasilan aklimatisasi di rumah kaca. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak jumlah tanaman yang berhasil diaklimatisasi semakin besar peluang untuk mendapatkan tanaman dihaploid.

KESIMPULAN

Keenam asal persilangan yang diuji pada penelitian ini memberikan respon yang bervariasi terhadap kultur antera padi. Asal persilangan G6 dan G5 menghasilkan respon induksi kalus dan regenerasi tanaman paling baik. Kedua

genotipe tersebut juga memberikan efisiensi pembentukan tanaman hijau (TH:JA) lebih tinggi dibandingkan keempat genotipe lainnya, yaitu 5.50% dan 4.65%. Dari keenam asal persilangan yang diuji hanya empat asal persilangan yang menghasilkan tanaman dihaploid yaitu G1 (2 tanaman), G2 (4 tanaman), G5 (21 tanaman), dan G6 (26 tanaman).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi atas pendanaan penelitian skema Hibah Penelitian Kompetensi. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada staf BB Biogen dan KP Muara BB Padi atas bantuan selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, B., I.S. Dewi, Sularjo, H. Safitri, A.P. Lestari. 2008. Perakitan padi tipe baru melalui seleksi silang berulang dan kultur anter. Pen. Pert. Tan. Pangan 27:1-8.
- Atlin, G.N., H.R. Lafitte, D. Tao, M. Laza, M. Amante, B. Courtois. 2006. Developing rice cultivars for high-fertility upland systems in the Asian tropics. Field Crop. Res. 97:43-52.
- Babu, R.C. 2010. Breeding for drought resistance in rice: an integrated view from physiology to genomics. Electronic J. Plant Breeding 1:1133-1141.
- Bagheri, N., N.B. Jelodar. 2008. Combining ability and heritability of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture. Biotech. 7:287-292.
- Basu, S.K., M. Datta, M. Sharma, A. Kumar. 2011. Haplod production technology in wheat and some selected higher plants. Aust J. Crop Sci. 5:1087-1093.
- Bernier, J., G.N. Atlin, R. Serraj, A. Kumar, D. Spaner. 2008. Breeding upland rice for drought resistance. J. Sci. Food Agr. 88:927-939.

- Cha-Um, S., B. Srianan, A. Pichakum, C. Kirdmanee. 2009. An efficient procedure for embryogenic callus induction and double haploid plant regeneration through anther culture of Thai aromatic rice (*Oryza sativa* L. subsp *indica*). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 45:171-179.
- Chen, Y. 1983. Anther and pollen culture of rice in China. p. 11-26. In Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Proceedings of a Workshop cosponsored by the Institute of Genetics, Academia Sinica and the International Rice Research Institute. Beijing, October 19-23 1981. Science Press, Beijing, China.
- Chung, G.S. 1992. Anther culture for rice improvement in Korea. p. 8-37. In K. Zheng, T. Murashige (Eds.). Anther Culture for Rice Breeders. Seminar and Training for Rice Anther Culture at Hangzhou, China. October 1992.
- da Silva, T. 2010. Indica rice anther culture: can the impasse be surpassed?. Plant Cell Tiss. Org. 100:1-11.
- Datta, S.K. 2005. Androgenic haploids: Factor controlling development and its application in crop improvement. Current Sci. 89:1870-1878.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko. 2001. Kultur antera untuk mendukung program pemuliaan tanaman padi. Bul. Agron. 29:59-63.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinoor, I.H. Somantri. 2004. Kultur antera padi pada beberapa formulasi media yang mengandung poliamin. J. Bioteknologi Pert. 9:14-19.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinoor, I.H. Somantri, M.A. Chozin. 2006. Regenerasi tanaman pada kultur antera beberapa aksesi padi *indica* toleran aluminium. J. Agrobiogen 2:30-35.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnoor, I.H. Somantri. 2007. Regenerasi tanaman pada kultur antera padi: pengaruh persilangan dan aplikasi putresin. Bul. Agron. 35:68-74.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko. 2008. Role of polyamines in inhibition of ethylene biosynthesis and their effects on rice anther culture development. Indonesian J. Agric. Sci. 9:60-67.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnoor, I.H. Somantri, M.A. Chozin. 2009. Plant regeneration from anther culture of several genotypes of indica rice tolerant to aluminum toxicity. Indonesian Journal of Agriculture. 2:1-5.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko. 2011. Kultur in vitro untuk produksi tanaman haploid androgenik. Hlm 107-157. Dalam: G.A. Wattimena, A.M. Nurhajati, N.M.A. Wiendi, A. Purwito, D. Efendi, B.S. Purwoko, N. Khumaida (Eds). Bioteknologi dalam Pemuliaan Tanaman. IPB Press.
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko. 2012. Kultur antera untuk percepatan perakitan varietas padi di Indonesia. J. Agro Biogen. 8:78-88.
- Fu, X., S. Yang, M. Bao. 2008. Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 44:194-202.
- Grewal, D., C. Manito, V. Bartolome. 2011. Doubled haploids generated through anther culture from crosses of elite *indica* and *japonica* cultivars and/or lines of rice: large-scale production, agronomic performance, and molecular characterization. Crop Sci. 51:2544-2553.
- He, T., Y. Yang, S.B. Tu, M.Q. Yu, X.F. Li. 2006. Selection of interspecific hybrids for anther culture of indica rice. Plant Cell Tiss. Org. 86:271-277.
- Herath, H.M.I., D.C. Bandara. 2011. Anther culture performance in selected high yielding *indica* (of Sri Lanka) and *japonica* rice varieties and their inter sub-specific hybrids. J. Natn. Sci. Foundation Sri Lanka 39:149-154.
- Herawati, R., B.S. Purwoko, N. Khumaida, I.S. Dewi, B. Abdullah. 2008. Pembentukan galur haploid ganda padi gogo dengan sifat-sifat tipe baru melalui kultur antera. Bul. Agron. 36:181-187.
- Kaushal, L., R. Sharma, S.M. Balachandran, K. Ulaganathan, V. Shenoy. 2014. Effect of cold pretreatment on improving anther culture response of rice (*Oryza sativa* L.). J. Exp. Bio. Agric. Sci. 2:233-242.
- Lee, S.Y., H.S. Kim, T.O. Kwon. 2004. Variation in anther culture response and fertility of backcrossed hybrid between indica and japonica rice (*Oryza sativa*). Plant Cell Tiss. Org. 79:25-30.
- Lestari, A.P., Y. Nugraha. 2006. Heterosis dan daya gabung galur mandul jantan dan pemulih kesuburan padi hasil teknik kultur anter. Pen. Pert Tan. Pangan 25:157-162.
- Pandey, S., H. Bhandari. 2008. Drought: economic costs and research implications. p. 3-17 In R. Serraj, J. Bennett, B. Hardy (Eds). Drought Frontiers in Rice: Crop Improvement for Increased Rainfed Production. World Scientific. IRRI.

- Purbokurniawan, B.S. Purwoko, D. Wirnas, I.S. Dewi. 2014. Potensi dan stabilitas hasil, serta adaptabilitas galur-galur padi gogo tipe baru hasil kultur antera. J. Agron. Indonesia 42:9-16.
- Safitri, H., B.S. Purwoko, D. Wirnas, I.S. Dewi, B. Abdullah. 2010. Daya kultur antera beberapa persilangan padi gogo dan padi tipe baru. J. Agron. Indonesia 38:81-87.
- Santosa, B., Sobir, S. Sujiprihati, K.R. Trijatmiko. 2011. Penyisipan gen *OsDREB1A* pada tanaman padi untuk regenerasi sifat toleran kekeringan. Pen. Pert. Tan. Pangan 30:95-100.
- Sasmita, P., B.S. Purwoko, S. Sujiprihati, I.H. Somantri, I.S. Dewi, M.A. Chozin. 2006. Evaluasi pertumbuhan dan produksi padi gogo haploid ganda toleran naungan dalam sistem tumpangsari. Bul. Agron. 34:79-86.
- Sasmita, P., B.S. Purwoko, S. Sujiprihati, I.H. Somantri. 2002. Kultur antera padi gogo hasil persilangan kultivar dengan galur toleran naungan. Hayati 9:89-93.
- Serraj, R., K.L. McNally, I.S. Loedin, A. Kohli, S.M. Haefele, G. Atlin, A. Kumar. 2011. Drought resistance improvement in rice: an integrated genetic and resource management.
- Talebi, R., M.R. Rahemi, H. Arefi, M. Nourozi, N. Bagheri. 2007. In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Pak. J. Biol. Sci. 10:2056-2060.
- Zhou, H. 1996. Genetics of green planlet regeneration from anther culture of cereals. p. 169-187. In S.M. Jain, S.K. Sopory, R.E. Veileux (Eds). *In Vitro Haplodip Production in Higher Plants*. Vol. 2. Application. Kluwer Acad. Publs., Netherlands.