

CATATAN PENELITIAN

Daya Regenerasi Padi *Indica cv. Bengawan Solo* dalam Dua Tipe Media Regenerasi dengan Penembakan Mikroprojektil

Regeneration Capacity of Indica Rice cv. Bengawan Solo in Two Types of Regeneration Media through Microprojectile Bombardment

TRI JOKO SANTOSO¹, SUDARSONO², HAJRIAL ASWIDINNOOR², IDA HANARIDA SOMANTRI^{1*}

¹*Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,
Jalan Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111*

²*Departemen Budi Daya Pertanian, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680*

Diterima 7 April 2004/Disetujui 13 Juli 2005

Factors affecting the success of gene delivery into cells/tissues of rice mediated by particle bombardment have been investigated. However, their effects on regeneration capacity of rice explants have not been investigated. Objectives of this experiments were to evaluate the effects of particle bombardment on regeneration capacity of *indica rice cv. Bengawan Solo* calli and the effects of four regeneration media on the development of bombardment calli. Calli of *indica rice* were initiated from mature seeds on callus-inducing medium. They were transferred on osmoticum containing medium prior to bombardment and maintained on the medium up to two days. Particle bombardment was conducted at 16 cm bombardment distance, 27 cm Hg helium pressure and using standard procedures for preparation of microprojectile particles. The bombarded calli were cultured on RNB or RMS regeneration medium, with or without spermidine addition. Results of the experiment indicated particle bombardment affected the survival of explants of *indica rice* but did not affect the development of the explants. The development of explants was rather dependent on the regeneration media than on the particle bombardment treatment. RMS medium was better than RNB medium for shoots inducing from bombarded *indica rice* explants.

Kendala biologis yang dihadapi dalam budi daya padi di Indonesia antara lain serangan hama wereng cokelat (Hanarida & Soewito 1993) dan hama penggerek batang padi (Pathak & Khan 1994). Menurut Badan Pusat Statistik (2002), dari 112.918 ha area pertanaman padi di 29 propinsi di Indonesia, menunjukkan adanya intensitas serangan penggerek batang padi sebesar 39.08%. Perakitan kultivar padi unggul yang resisten merupakan pilihan yang murah dan efektif untuk pengendalian hama tersebut. Permasalahan yang dihadapi dalam pengembangan kultivar padi yang resisten adalah tidak tersedianya plasma nutfah padi, termasuk varietas-varietas lokal, dengan tingkat ketahanan yang tinggi terhadap hama tersebut untuk dijadikan sebagai tetua dalam program pemuliaan tanaman.

Oleh karena itu, alternatif teknologi rekayasa genetika untuk mengembangkan plasma nutfah padi transgenik yang resisten terhadap hama wereng cokelat dan penggerek batang padi perlu digunakan. Keberhasilan penerapan rekayasa genetika tanaman sangat bergantung pada kemampuan untuk mengintroduksi gen ke dalam sel/jaringan dan untuk meregenerasikan tanaman transgenik dari sel/jaringan transgenik yang didapat. Dalam hal ini, tersedianya teknik transformasi genetika untuk mengintroduksi gen ke dalam

sel/jaringan tanaman dan teknik kultur jaringan untuk meregenerasikan sel/jaringan transgenik menjadi tanaman transgenik merupakan prasyarat yang harus dipenuhi. Pengembangan teknik kultur jaringan yang efektif untuk meregenerasikan sel/jaringan menjadi tanaman perlu dilakukan agar keberhasilan penerapan rekayasa genetika pada tanaman padi dapat ditingkatkan.

Daya regenerasi sel/jaringan menjadi tanaman secara *in vitro*, disamping dipengaruhi oleh genotipenya, juga dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain: komposisi hara makro dan mikro penyusun media regenerasi, penambahan berbagai senyawa organik dan berbagai zat pengatur tumbuh tanaman dalam media regenerasi. Padi *indica* dikenal mempunyai daya regenerasi rendah yaitu sekitar 1-5%, sehingga pengembangan teknik kultur jaringan untuk meningkatkan daya regenerasi sel/jaringan padi *indica* akan membantu rekayasa genetika tanaman ini. Media dasar NB [media yang mengandung unsur makro dari media dasar N6 (Chu *et al.* 1975), unsur mikro dan vitamin dari media dasar B5 (Gamborg & Shyluk 1981)] dan MS (Murashige & Skoog 1962) telah digunakan untuk meregenerasikan tanaman dari sel/jaringan padi *indica* secara *in vitro* (Fauquet *et al.* 1996; Rubi *et al.* 1999). Namun demikian, keefektifan kedua media tersebut untuk menginduksi regenerasi tanaman padi *indica* belum diuji secara berdampingan.

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-337975,
Fax. +62-251-338820, E-mail: sdg_balitbio@indo.net.id

Beberapa jenis poliamin, antara lain spermidin dan spermin atau berbagai senyawa prekursornya seperti putresin merupakan senyawa polikation yang banyak dijumpai dalam berbagai jaringan tanaman. Poliamin diketahui berfungsi dalam berbagai proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman, antara lain regenerasi embrio somatik dalam kultur *in vitro* (Shoeb *et al.* 2001). Penambahan poliamin dalam media *in vitro* diduga dapat membantu regenerasi embrio somatik dari eksplan yang ditanam. Pada kultur anter padi secara *in vitro*, penambahan poliamin dalam media regenerasi dilaporkan meningkatkan produksi kalus dan regenerasi tanaman (Usman 1999; Yuskianti 2001).

Penembakan mikroproyektil (*microprojectile bombardment*) menggunakan *gene gun* merupakan teknik transformasi genetika yang sering digunakan untuk mengintroduksi gen ke sel/jaringan tanaman monokotil, terutama pada sel/jaringan tanaman padi. Fauquet *et al.* (1996) melaporkan bahwa pada tanaman padi japonica, efisiensi transformasi menggunakan mikroproyektil mencapai 25%. Partikel emas atau tungsten yang telah dilapisi DNA dengan konsentrasi tertentu ditembakkan ke sel/jaringan tanaman padi untuk mengintroduksi DNA. Proses introduksi gen dengan penembakan mikroproyektil seringkali menyebabkan terjadinya kerusakan sel/jaringan yang ditembak. Selanjutnya, kerusakan ini dapat meningkatkan kematian eksplan dan menurunkan daya regenerasi sel/jaringannya.

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah mengevaluasi daya regenerasi padi indica cv. Bengawan Solo dalam dua media regenerasi. Selain itu penelitian bertujuan untuk mempelajari pengaruh penambahan spermidin dalam media regenerasi dan pengaruh penembakan mikroproyektil terhadap daya regenerasi tanaman padi indica cv. Bengawan Solo secara *in vitro*.

Benih padi indica cv. Bengawan Solo disterilkan dengan direndam dalam alkohol 70% selama satu menit, dalam larutan Chlorox 20% (v/v) selama 30 menit dan dibilas tiga kali dengan air steril. Setelah benih disterilkan, embrio diisolasi dari benih padi dan digunakan sebagai eksplan untuk menginduksi pembentukan kalus embriogen. Induksi kalus embriogen dilakukan dalam media yang terdiri atas media dasar NB (Chu *et al.* 1975), unsur mikro dan vitamin dari media dasar B5 (Gamborg & Shyluk 1981), dengan penambahan 500 mg/l L-prolin, 500 mg/l L-glutamin, 300 mg/l kasein hidrolisat, 30 g/l sukrosa, 3 g/l fitagel, dan 2 mg/l 2,4-D. Sebelum disterilkan pada suhu 121 °C selama 20 menit, dan tekanan 1.2 kg/cm², pH media diatur hingga 5.8 dengan penambahan NaOH. Kalus embriogen mulai terbentuk 3-4 minggu setelah penanaman eksplan dalam media. Kalus embriogen yang didapat dipindahkan pada media induksi yang sama yang masih segar setiap tiga minggu.

Untuk menyiapkan empat kali penembakan, partikel emas berdiameter 1.0 µm sebanyak 1.4 mg disterilkan dalam 50 µl etanol absolut dan divorteks selama satu menit. Setelah disentrifugasi selama 10 detik dengan kecepatan 8300 x g, supernatan dibuang dan endapan partikel emasnya disuspensikan dalam 50 µl air steril, dikocok selama 1 menit, dan disentrifugasi selama 10 detik dengan kecepatan 8300 x g.

Pencucian partikel emas dengan cara tersebut dilakukan dua kali lagi dengan cara yang sama.

Partikel emas yang telah steril disuspensikan dalam 50 µl air steril dan ke dalamnya ditambahkan 1 µg/µl DNA plasmid dan 20 µl spermidin 0.1 M, 50 µl CaCl₂ 2.5 M, dan divorteks selama 3 menit. Campuran disentrifugasi selama 10 detik dengan kecepatan 8300 xg. Setelah dipisahkan dari supernatan, partikel emas disuspensikan dalam 60 µl etanol absolut. Untuk satu kali penembakan, suspensi partikel emas 10 µl dalam etanol absolut disebarakan ke bagian tengah dari *macrocarrier*.

Kalus embriogen ditanam selama empat jam sebelum dan 16-20 jam sesudah dilakukan penembakan mikroproyektil dalam media induksi kalus dengan penambahan senyawa osmotikum manitol 30 g/l dan sorbitol 30 g/l untuk mengurangi terjadinya kerusakan sel/jaringan. Kalus diposisikan secara melingkar dengan diameter 2.5 cm di tengah-tengah media sebagai daerah sasaran dari penembakan mikroproyektil.

Prosedur penembakan mikroproyektil dilakukan sesuai dengan metode baku dari *Gene Gun* (Biorad, Biolistic PDS 1000/He). Penembakan dilakukan dalam kondisi vakum sebesar 27 inci air raksa (in Hg), tekanan gas helium untuk percepatan *microcarrier* sebesar 1100 psi, jarak tembak enam cm dan satu kali penembakan. Semua bahan dan perlengkapan yang diperlukan untuk penembakan mikroproyektil disterilkan dengan direndam dalam etanol 95% selama 10 menit dan dikering-anginkan dalam laminar. Setelah penembakan mikroproyektil, kalus embriogen tetap dikulturkan pada media induksi kalus dengan penambahan osmotikum dan diinkubasi dalam kondisi gelap di ruang kultur bersuhu 26 °C selama 16-20 jam. Selanjutnya, kalus dipindahkan ke media induksi kalus tanpa senyawa osmotikum dan diinkubasi dalam kondisi gelap di ruang kultur dengan suhu 26 °C selama dua minggu untuk membantu proliferasi kalus.

Kalus yang berkembang dipindahkan ke media prerenerasi dan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 2 minggu. Media prerenerasi yang digunakan adalah pre-regenerasi NB (PRNB) [media dasar NB dengan penambahan 2 mg/l 6-Benzylaminopurine (BAP), 1 mg/l α-Naphthalene acetic acid (NAA), dan 5 mg/l ABA] atau media pre-regenerasi MS (PRMS) [media dasar MS dengan penambahan 2 mg/l BAP, 1 mg/l NAA, dan 5 mg/l ABA]. Untuk menginduksi pembentukan tunas, kalus yang telah ditumbuhkan pada media PRNB dipindahkan ke media regenerasi NB (RNB) sedangkan kalus yang ditumbuhkan dalam media PRMS dipindahkan ke media regenerasi MS (RMS), masing-masing dengan atau tanpa penambahan spermidin 0.1 mM. Selanjutnya, semua kultur diinkubasikan dengan penyinaran 1000 lux selama 16 jam sehari dalam ruang kultur bersuhu 26 °C selama empat minggu. Kalus dipindahkan ke media regenerasi tunas yang masih segar setiap dua minggu hingga terbentuk tunas.

Untuk menginduksi pembentukan planlet, tunas diakarkan dalam media pengakaran (media dasar MS, dengan penambahan sukrosa 30 g/l dan fitagel 0.3% (w/v)) selama dua minggu atau sampai terbentuk akar. Sebelum dipindahkan ke rumah kaca, dilakukan aklimatisasi planlet secara bertahap dengan menanam planlet selama satu minggu dalam tabung

reaksi berdiameter 1.5 cm dan tinggi 15 cm yang berisi air 5 ml dan selama dua minggu dalam bak plastik ukuran 44 x 34 x 15 cm yang berisi tanah sawah. Planlet yang berhasil bertahan hidup dalam periode aklimatisasi selanjutnya dipindahkan ke dalam pot plastik dengan volume 10 l yang berisi tanah sawah.

Dalam percobaan ini, peubah yang diamati meliputi persentase eksplan yang mati akibat perlakuan penembakan mikroproyektil, proliferasi kalus, pembentukan kalus hijau, regenerasi tunas, dan pembentukan planlet. Data yang didapat selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan paket program analisis statistik SAS (SAS 1990).

Perlakuan fisik penembakan mikroproyektil untuk mengintroduksi partikel emas yang membawa materi DNA dengan konsentrasi 1 µg/µl ke dalam sel tanaman berpengaruh nyata ($p \leq 0.05$) terhadap tingkat kematian eksplan. Dua minggu setelah perlakuan penembakan, eksplan 11.8% dengan perlakuan penembakan tidak dapat berkembang dan mati (Tabel 1). Sebaliknya, tingkat kematian eksplan yang tidak diberi perlakuan penembakan mikroproyektil hanya 2.7% (Tabel 1). Kematian eksplan pada perlakuan tanpa penembakan kemungkinan terjadi karena kondisi biologis eksplan, seperti ukuran kalus yang terlalu kecil sehingga tidak dapat berkembang. Hal itu akibat pelukaan pada saat pemotongan kalus atau akibat penambahan osmotikum dalam media. Untuk kalus dengan perlakuan penembakan mikroproyektil, terjadinya kematian eksplan kemungkinan juga dapat disebabkan oleh kerusakan sel/jaringan eksplan akibat penetrasi mikroproyektil emas.

Eksplan kalus yang masih hidup setelah periode penyembuhan (dua minggu setelah perlakuan penembakan) mengalami proliferasi membentuk masa kalus yang lebih besar. Ketika diinkubasikan dalam ruang kultur dengan pencahayaan 16 jam/hari, kalus yang didapat berkembang menjadi hijau. Untuk perlakuan dengan atau tanpa penembakan, eksplan yang ditanam pada empat macam media yang diuji mempunyai persentase eksplan berkalus yang tidak berbeda nyata ($p \leq 0.05$). Pada perlakuan tanpa penembakan, media yang digunakan tidak berpengaruh nyata ($p \leq 0.05$) terhadap pembentukan kalus hijau dari eksplan. Untuk perlakuan dengan penembakan, persentase pembentukan kalus hijau dari eksplan berbeda nyata ($p \leq 0.05$) pada perlakuan media RNB spermidin dan media RMS (Tabel 2).

Eksplan yang membentuk kalus hijau umumnya berkembang lebih lanjut membentuk tunas dalam media regenerasi. Eksplan pada media RMS dengan atau tanpa penambahan spermidin mempunyai persentase **eksplan bertunas** lebih tinggi dibandingkan media RNB (Tabel 3). Pola yang sama juga diamati untuk peubah **jumlah tunas** yang terbentuk tiap eksplan (Tabel 4). Jumlah tunas per eksplan yang lebih banyak dibandingkan pada media RNB atau RNB + spermidin (Tabel 4).

Tunas yang berkembang dari eksplan dapat diakarkan dengan baik dalam media pengakaran. Perlakuan penembakan mikroproyektil dan media regenerasi yang digunakan tidak berpengaruh terhadap regenerasi planlet dari tunas dan

kemampuan planlet untuk melewati kondisi aklimatisasi. Hal ini berarti diperoleh tanaman padi hasil kultur *in vitro* yang berhasil tumbuh dalam media tanah. Pada Gambar 1 disajikan tahapan perkembangan eksplan dalam media induksi kalus, regenerasi tunas, dan aklimatisasi tunas hingga diperoleh tanaman padi cv. Bengawan Solo hasil kultur *in vitro*.

Tabel 1. Persentase kalus yang mati akibat perlakuan penembakan setelah ditanam selama dua minggu dalam media induksi kalus tanpa osmotikum

Perlakuan	Kalus yang mati (%)	Kalus yang hidup (%)
Tanpa penembakan	2.7b	97.3a
Dengan penembakan	11.8a	88.2b

Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata berdasarkan uji beda nyata terkecil pada taraf $\alpha=5\%$

Tabel 2. Perkembangan eksplan kalus padi indica cv. Bengawan Solo setelah perlakuan penembakan mikroproyektil dalam berbagai media regenerasi tunas

Perlakuan media	Eksplan berkalus (%)		Eksplan berkalus hijau (%)	
	DP	TP	DP	TP
RNB	14.3aA	15.9aA	38.4abA	55.8aA
RNB + Spermidin	12.2aA	16.2aA	22.1bB	57.8aA
RMS	16.0aA	16.2aA	49.3aA	39.9abA
RMS + Spermidin	13.4aA	17.5aA	42.5abA	49.4aA

Untuk masing-masing peubah, angka yang diikuti dengan huruf kecil yang sama dalam kolom atau huruf besar yang sama dalam baris tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada taraf $\alpha=5\%$. DP dan TP: dengan atau tanpa perlakuan penembakan mikroproyektil. RNB: media dasar NB + 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA; RMS: media dasar MS + 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA.

Tabel 3. Jumlah tunas yang terbentuk dari eksplan kalus padi indica cv. Bengawan Solo setelah perlakuan penembakan mikroproyektil dalam berbagai media regenerasi tunas

Perlakuan media	DP	TP	Rata-rata
RNB	1.0b	4.5b	2.8b
RNB + Spermidin	0.0b	1.2b	0.6b
RMS	21.6a	25.0a	23.3a
RMS + Spermidin	22.9a	35.9a	29.6a

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada taraf $\alpha = 5\%$. DP dan TP: dengan dan tanpa perlakuan penembakan mikroproyektil. RNB: media dasar NB + 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA; RMS: media dasar MS + 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA.

Tabel 4. Rataan pembentukan tunas per eksplan kalus padi indica cv. Bengawan Solo setelah perlakuan penembakan mikroproyektil dalam berbagai media regenerasi tunas

Perlakuan media	DP	TP	Rata-rata
RNB	1.0b	1.8b	1.4b
RNB + Spermidin	0.0b	1.0b	0.6b
RMS	2.2a	2.5a	2.4a
RMS + Spermidin	1.9a	3.5a	2.7a

Angka yang diikuti dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada taraf $\alpha = 5\%$. DP dan TP: dengan dan tanpa perlakuan penembakan mikroproyektil. RNB: media dasar NB + 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA; RMS: media dasar MS + 0.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA.

Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan perlakuan penembakan mikroprojektil dalam transformasi genetika padi hanya berpengaruh terhadap persentase kematian jaringan eksplan saat dua minggu pertama setelah perlakuan penembakan. Setelah periode dua minggu, perlakuan penembakan ini sudah tidak berpengaruh terhadap perkembangan eksplan padi indica cv. Bengawan Solo. Pengaruh negatif dari perlakuan penembakan mikroprojektil terhadap daya regenerasi tanaman dari eksplan telah dilaporkan sebelumnya pada tanaman jagung, gandum, dan padi (Kemper *et al.* 1996; Rubi *et al.* 1999; Harwood *et al.* 2000). Pada berbagai tanaman tersebut, daya regenerasi tanaman dari eksplan yang diberi perlakuan penembakan mikroprojektil nyata menurun dibandingkan dengan eksplan tanpa perlakuan penembakan mikroprojektil. Salah satu faktor penyebab penurunan daya regenerasi tanaman yang terjadi adalah akibat kerusakan jaringan eksplan setelah perlakuan penembakan mikroprojektil (Birch & Bower 1994; Chibbar & Kartha 1994).

Setelah periode penyembuhan dari kerusakan jaringan akibat perlakuan penembakan mikroprojektil dapat dilewati, perkembangan eksplan lebih dipengaruhi oleh media tumbuh yang digunakan untuk meregenerasikan tunas dari eksplan. Media RNB dan RMS, dengan atau tanpa penambahan spermidin mempunyai pengaruh yang sama terhadap proliferasi kalus dari eksplan dan pembentukan kalus hijau. Tetapi, kedua tipe media mempunyai kemampuan yang berbeda untuk menginduksi pembentukan tunas dari eksplan kalus padi indica cv. Bengawan Solo.

Media regenerasi tunas dengan komposisi dasar media MS lebih baik digunakan dibandingkan dengan media regenerasi dengan komposisi dasar media NB. Berlawanan dengan informasi yang telah ada, dalam percobaan ini

penambahan spermidin ke dalam media regenerasi tanaman tidak memberikan dampak positif yang diharapkan. Penambahan senyawa spermidin dilaporkan berpengaruh positif terhadap kemampuan regenerasi tanaman padi (Shoeb *et al.* 2001) dan peningkatan produksi kalus serta regenerasi tanaman hijau pada kultur antera padi (Usman 1999; Purwoko *et al.* 2001; Yuskianti 2001).

Media regenerasi tunas dengan komposisi dasar media NB (Chu *et al.* 1975), unsur mikro dan vitamin dari media dasar B5 (Gamborg & Shyluk 1981)] dilaporkan mampu menginduksi pembentukan tunas dari eksplan padi japonica yang telah diberi perlakuan penembakan mikroprojektil (Fauquet *et al.* 1996; Lee *et al.* 2003). Dalam media regenerasi tunas dengan komposisi media dasar NB, efisiensi regenerasi tunas setelah perlakuan penembakan mikroprojektil yang dilaporkan berkisar antara 8-50% (Fauquet *et al.* 1996).

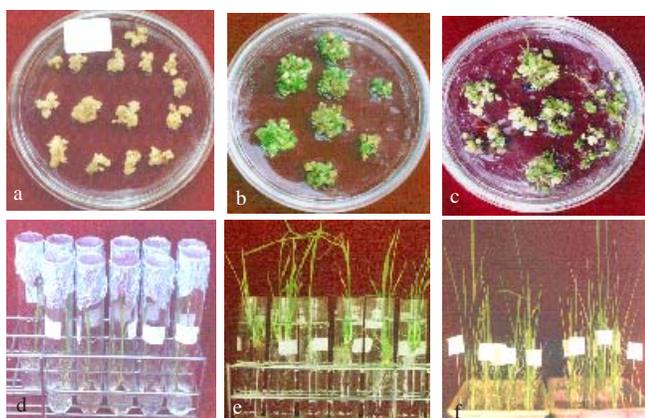
Sebaliknya, media regenerasi tunas dengan komposisi dasar media MS (Murashige & Skoog 1962) juga telah dilaporkan mampu menginduksi pembentukan tunas dari eksplan padi japonica dan indica yang telah diberi perlakuan penembakan mikroprojektil (Rubi *et al.* 1999; Pons *et al.* 2000). Dalam media regenerasi tunas dengan komposisi dasar media MS, efisiensi regenerasi tunas setelah perlakuan penembakan mikroprojektil yang dilaporkan berkisar 20-60% (Rubi *et al.* 1999).

Dalam kegiatan transformasi genetika untuk mengintroduksi gen ke sel/jaringan tanaman dan meregenerasikan tanaman transgenik, tersedianya metode kultur *in vitro* yang efisien untuk meregenerasikan tunas dari eksplan menjadi sangat penting. Penggunaan teknik *in vitro* yang efisien dalam menginduksi pembentukan tunas dari eksplan untuk mendukung transformasi genetika akan meningkatkan kemungkinan didapatkannya tanaman transgenik. Sebaliknya jika efisiensi regenerasi tanamannya rendah, maka kemungkinan didapatkannya tanaman transgenik hasil transformasi genetika juga akan menurun.

Dalam percobaan ini kondisi transformasi genetika dengan penembakan mikroprojektil yang tidak berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan telah dievaluasi. Media regenerasi tunas dengan komposisi dasar media MS lebih disarankan untuk meregenerasikan tanaman dari eksplan padi indica cv. Bengawan Solo yang telah diberi perlakuan penembakan mikroprojektil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian ini dibiayai oleh APBN Proyek Bioteknologi Pertanian: Perakitan tanaman transgenik tahan hama atau penyakit tanaman, no kontrak: RPTP 01.6330.B, mulai tahun 2002, Departemen Pertanian, Republik Indonesia. Tri Joko Santoso mendapatkan dana beasiswa dari Proyek ARMP II, Departemen Pertanian, Republik Indonesia, untuk Program Pendidikan Pascasarjana (S2).



Gambar 1. Tahapan perkembangan eksplan padi indica cv. Bengawan Solo dari kalus hingga terbentuknya tunas setelah penembakan mikroprojektil. a. kalus embriogen dalam media induksi kalus, b. pembentukan kalus hijau pada media regenerasi RMS, c. pembentukan tunas pada media regenerasi RMS, d. pengakaran tunas dalam tabung reaksi berisi media perakaran, e. aklimatisasi planlet dalam tabung reaksi berisi air, dan f. planlet yang tetap hidup setelah ditanam dalam media tanah.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik. 2002. *Statistik Indonesia*. Jakarta: BPS.
- Birch RG, Bower R. 1994. Principles of gene transfer using particle bombardment. Di dalam: SunYang N, Christou P (ed). *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*. New York: Oxford Univ Pr. hlm 3-37.
- Chibbar RN, Kartha KK. 1994. Transformation of plant cell by bombardment with microprojectiles. Di dalam: Shangoon PT, Ngo TT (ed). *Biotechnological Applications of Plant Cultures*. Boca Raton: CRC Pr. hlm 37-60.
- Chu CC *et al.* 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci Sin* 18:659-668.
- Fauquet CM *et al.* 1996. Biolistic transformation of rice: now efficient and routine for japonica and indica rice. Di dalam: Kush GS (ed). *Proceeding of The Third International Rice Genetic Symposium*; Manila, 16-20 Okt 1995. hlm 153-165.
- Gamborg OL, Shyluk JP. 1981. Nutrition, media and characteristic of plant cell and tissue culture. Di dalam: Thorpe TA (ed). *Plant Tissue Culture Methods and Application in Agriculture*. New York: Academic Pr. hlm 21-44.
- Hanarida IS, Soewito T. 1993. Peningkatan ketahanan varietas padi terhadap wereng coklat (*Nilaparvata ligens* Stal.). *Bul Penel* 6:1-24.
- Harwood WA, Ross SM, Cilento P, Snape JW. 2000. The effect of DNA/gold particle preparation technique, and particle bombardment device, on the transformation of barley (*Hordeum vulgare*). *Euphytica* 111:67-76.
- Kemper EL, Silva MJ, Arruda P. 1996. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Sci* 121:85-93.
- Lee SI *et al.* 2003. A routine system for generation of fertile transgenic rice plants using biolistic method. *Plant Biotech J* 5:165-170.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473-497.
- Pathak MD, Khan ZR. 1994. *Insect Pest of Rice*. Philippines: International Research Rice Institute.
- Pons MJ, Marfa V, Mele E, Messeguer J. 2000. Regeneration and genetic transformation of Spanish rice cultivar using mature embryos. *Euphytica* 114:117-122.
- Purwoko BS, Dewi IS, Usman AW. 2001. Poliamina meningkatkan regenerasi tanaman hijau pada kultur antera padi cv. Taipei 309. *Hayati* 8:117-120.
- Rubi JA, Carbonero P, Diaz I. 1999. Parameters influencing the regeneration capacity of calluses derived from mature indica and japonica rice seeds after microprojectile bombardment. *Euphytica* 107:115-122.
- SAS PC. 1990. SAS/STAT User's Guide Version 6. SAS Institute Inc.
- Shoeb F, Yadav JS, Bajaj S, Rajam MV. 2001. Polyamines as biomarkers for plant regeneration capacity: improvement of regeneration by modulation of polyamine metabolism in different genotypes of indica rice. *Plant Sci* 160:1229-1235.
- Usman AW. 1999. Pengaruh poliamin terhadap induksi kalus dan regenerasi tanaman hijau pada kultur anter padi cv. T309 [Tesis]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Yuskianti V. 2001. Aplikasi poliamin pada kultur anter padi silangan reprotokikal Jatiluhur x Grogol untuk meningkatkan produksi kalus dan regenerasi tanaman hijau [Tesis]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.