

**Kultur Antera, Teknik Penyelamatan Embrio
dan Rekayasa Genetik untuk Menunjang Pemuliaan Tanaman Padi**

*Anther Culture, Embryo Rescue,
and Genetic Engineering to Support Rice Breeding*

Ida Hanarida Somantri¹⁾ dan A. Dinar Ambarwati¹⁾

ABSTRACT

The success of biotechnology in developed country encouraged Indonesia to use it in rice breeding program. Every technique in biotechnology has advantage and it can be used to solve a problem in a certain purpose. Embryo rescue technique solved the problem of crossing with wild species. This technique may insert a gene from one organism to another through gene transformation technique. The anther culture technique has been used on rice: Japonica, Javanica and Indica. Generally, the percentage of callus induction and regeneration has great variation (1.8% - 40%). It was influenced by the number and type of genome. The transformation of rice using microprojectile system using cry gene resulted 172 putative transgenic plants. Twenty five of them have been tested using molecular technique and it showed that the plants contained cry gene.

Key words: Anther culture, Embryo rescue, Rice

PENDAHULUAN

Padi merupakan makanan pokok sebagian besar penduduk Indonesia, sehingga kedudukannya sangat penting dan strategis ditinjau dari segala segi. Untuk mengimbangi laju pertumbuhan penduduk yang berakibat meningkatnya kebutuhan akan beras bukan merupakan pekerjaan yang mudah, karena berbagai kendala produksi seringkali menyebabkan kegagalan.

Pemuliaan tanaman untuk mendapatkan varietas unggul adalah salah satu usaha dalam menanggulangi kendala produksi. Namun demikian pemuliaan tanaman dengan cara persilangan dua atau lebih individu, yang dilanjutkan dengan seleksi sering menghadapi hambatan; antara lain: inkompatibilitas dan tidak tersedianya sumber gen yang diperlukan dalam plasma nutfah budidaya.

Bioteknologi menawarkan beberapa cara yang dapat diaplikasikan dalam pemuliaan tanaman padi, yaitu kultur jaringan, teknik penyelamatan embrio untuk persilangan yang melibatkan kerabat liar, analisis isoenzim atau DNA untuk berbagai sifat, serta rekayasa genetik. Dalam tulisan ini dikemukakan beberapa hasil kegiatan yang dilakukan di Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, yang meliputi kultur antera (jaringan), teknik penyelamatan embrio dan transformasi (rekayasa genetik).

Kultur Antera

Pertanaman F1 hasil persilangan antara tetua akan menghasilkan progeni yang bersegregasi. Untuk mendapatkan progeni-progeni yang homozigos melalui perpanjangan generasi diperlukan sekitar 8 generasi (F8). Kultur antera adalah salah satu teknik kultur jaringan yang dapat mempercepat proses mendapatkan galur homozigos melalui penggandaan. Menurut Zapata (1990), secara teoritis kultur antera memiliki beberapa keuntungan yakni: (a) memperoleh siklus pemuliaan dengan didapaknya homozigositas secara cepat; (b) menambah efisiensi seleksi; (c) memperluas variabilitas genetik melalui produksi variasi gametoklonal; dan (d) gen resesif terekspresi lebih cepat.

Teknik kultur antera pertama kali berhasil pada sub spesies padi japonica tahun 1968 (Niizeki dan Oono, 1968). Selanjutnya penelitian diperluas untuk Indica (Karim, 1987; Reddy *et al.*, 1985). Sedangkan untuk Javanica yang banyak terdapat di Indonesia tampaknya belum mendapat perhatian. Di Indonesia, kultur antera padi diperkenalkan pada tahun 1991 dan masih terus digunakan dalam program pemuliaan padi (Dewi *et al.*, 1996; Hanarida, 1997; Suwarno, 1996).

Keberhasilan kultur antera dalam arti persentase regenerasi yang memadai untuk dapat melakukan seleksi, tentu sangat membantu program pemuliaan

¹⁾ Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

padi. Namun demikian beberapa hal sangat mempengaruhi keberhasilan kultur antera, yaitu komposisi media, praperlakuan eksplan, genotipe tanaman, lingkungan, dan stadia eksplan. Faktor-faktor tersebut selain mempengaruhi efisiensi regenerasi itu sendiri, juga mengakibatkan permasalahan albino. Penelitian untuk mengatasi kendala pembentukan albino dalam teknik kultur antera telah dilakukan (Purwoko *et al.*, 2000) yaitu dengan penambahan poliamin kepada media induksi kalus dan regenerasi.

Secara umum metode kultur antera adalah sebagai berikut : (1) eksplan dikoleksi pada saat bunting; (2) pra

perlakuan pada suhu 5° C selama (10-12) hari; (3) induksi kalus; (4) regenerasi; dan (5) aklimatisasi.

Pada Tabel 1, disajikan beberapa hasil penelitian yang dilakukan di Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor. Tampak bahwa efisiensi induksi kalus dan regenerasi masih rendah dan sangat bervariasi. Namun demikian beberapa genotipe memberikan jumlah lebih dari 100 tanaman, sehingga memberikan peluang untuk dapat melakukan seleksi. Permasalahan albino juga terlihat dimana tanaman albino jumlahnya kebanyakan jauh melebihi tanaman hijau.

Tabel 1. Induksi kalus dan regenerasi tanaman hasil kultur antera

Genotipe	Antera	Kalus (dalam %)	Regenerasi		Sumber
			Albin	Hijau (dalam %)	
Taipei 309	4270	1069 (25)	39	121 (11.3)	1
Cisanggarung	2720	843 (31)	-	17 (2.02)	4
Pucuk1	590	27 (1.7)	0	5 (18.5)	3
Mesir	2600	223 (8.6)	0	38 (1.7)	3
Mahakam/Simariti	54.576	1588 (2.9)	171	49 (3.1)	3
Mahakam/Pucuk	42.680	576 (1.3)	57	109 (18.9)	3
Mesir/Grogo	128.044	870 (3.1)	116	27 (3.1)	3
Mesir/IRAT 144	26.690	1411 (5.3)	562	58 (4.1)	3
Lalan/Simariti	4.750	73 (1.5)	27	7 (9.6)	3
Mahsuri/Sei Lilin	46.050	570 (1.2)	152	105 (18.4)	2
Batang Ombilin/IR64	27.000	350 (1.3)	27	144 (41.1)	2

Sumber : 1. Masyhudi, M.F., 1992; 2. Hanarida dan Rianawati, 1996;
3. Suhartini *et al.*, 1997; 4. Masyhudi *et al.*, 1997.

Teknik Penyelamatan Embrio

Spesies padi liar merupakan sumber genetik yang sangat penting dari berbagai sifat, misalnya : ketahanan terhadap penyakit, hama dan lingkungan rawan. Beberapa sumber keragaman yang dimiliki spesies liar ini kadang-kadang atau bahkan tidak tersedia sama sekali pada padi budidaya (Brar, 1990). Menurut Khush (1990) terdapat kira-kira 20 spesies *Oryza* selain *Oryza sativa*, diantaranya adalah *O. officinalis* (CC) dan *O. rufipogon* (AA) yang mempunyai ketahanan terhadap virus tungro (Kobayashi *et al.*, 1994); *O. Australiensis* (EE) dan *O. rhizomatis* (CC) untuk tahan kekeringan; padi liar dengan genom CCDD *O. grandiglumis*, *O. latifolia* dan *O. alta* untuk produksi biomasa tinggi; *O. minuta* (BBCC) dan *O. punctata* (BB, BBCC) untuk ketahanan terhadap wereng coklat; *O. brachyantha* (FF) dengan sifat ketahanan terhadap penggerek batang padi kuning. Dengan memindahkan sifat-sifat penting tersebut ke dalam padi budidaya, akan diperoleh perluasan genetik untuk keperluan pemuliaan tanaman.

Namun demikian, di dalam melakukan persilangan padi budidaya dengan padi liar (kerabat jauh) sering dijumpai beberapa kendala alami seperti aborsi atau gugurnya embrio setelah 14 hari fertilisasi, biji hibrida yang dihasilkan sedikit dan lemah, serta masalah sterilitas pada tanaman F1. Teknik penyelamatan embrio (embryo rescue) merupakan suatu cara untuk mengatasi permasalahan tersebut.

Padi budidaya Indica dan Javanica (IR64, Pandan Wangi, Cisadane, Memberamo) digunakan sebagai tetua betina sedangkan spesies padi liar sebagai tetua jantan. Bunga dari tanaman betina dikastrasi kemudian diserbuk dengan serbuk sari spesies liar. Setelah penyerbukan, malai disemprot dengan hormon GA₃ (asam giberelik) dan ditutup dengan kertas minyak. Biji hibrida berumur 10-14 hari setelah penyerbukan diselamatkan melalui teknik penyelamatan embrio berdasarkan metode standar IRRI (1991). Embrio muda diisolasi dengan bantuan mikroskop dan ditanam pada

media ¼ MS dalam tabung reaksi sampai membentuk tanaman lengkap.

Aborsi atau gugurnya embrio pada persilangan kerabat jauh terjadi karena tidak berkembangnya endosperm akibat tidak adanya perpasangan antar kromosom kedua tetua yang berbeda genom (Khush dan Brar, 1990). Dari sejumlah kombinasi persilangan yang dilakukan, persentase biji hibrida (seed set) bervariasi dalam kisaran 1.8-40% (Tabel 2). Biji hibrida diperoleh dari hasil perbandingan jumlah bunga yang membentuk biji hibrida dengan jumlah bunga yang disilangkan.

Persentase biji hibrida tertinggi (40%) diperoleh dari persilangan padi budidaya Memberamo dengan *O. rufipogon* yang bergenom AA. Secara umum, persilangan yang melibatkan padi liar yang bergenom AA memberikan peluang terbentuknya biji hibrida yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang bergenom selain AA (Brar, 1991). Sebaliknya Nezu *et al.* (1960) berpendapat bahwa spesies dengan genom yang sama

tidak menjamin terbentuknya embrio hibrid, karena ada kemungkinan terdapat perbedaan struktur gen dan kromosom dari kedua spesies. Persilangan yang dilakukan Brar (1991) antara *O. sativa* dengan *O. nivara* (AA) menghasilkan persentase biji hibrida yang tinggi dari 9,1-62,2%, sedangkan dengan *O. australiensis* (EE) menghasilkan 0,5-3,2%. Beberapa penelitian yang dilakukan di Balitbio dengan padi liar *O. australiensis* memberikan persentase seed set yang lebih tinggi yaitu 4,1-16,9%.

Dari sejumlah biji hibrida yang dihasilkan, tidak semua embrionya bisa ditanam/dikulturkan pada media. Demikian pula pada saat embrio ditanam, tidak semuanya bisa tumbuh membentuk tanaman lengkap (planlet). Kegagalan terutama disebabkan adanya kontaminasi atau tidak sempurnanya proses isolasi sehingga embrio rusak. Dari planlet yang dihasilkan kemudian dialimatisasi dan dipelihara sampai membentuk tanaman dewasa.

Tabel 2. Hasil penyelamatan embrio persilangan padi budidaya dengan padi liar.

No.	Kombinasi persilangan	Bunga disilangkan	Biji hibrida	Embrio ditanam	Embrio tumbuh
1.	IR64 x <i>O. officinalis</i>	639	62 (9.7)	50	9 (18)
	IR64 x <i>O. australiensis</i>	169	7 (4.1)	7	3 (42.9)
	IR64 x <i>O. grandiglumis</i>	347	59 (17)	56	16 (28.6)
	IR64 x <i>O. latifolia</i>	53	1 (1.8)	1	1 (100)
	IR64 x <i>O. punctata</i>	53	2 (3.8)	2	1 (50)
	IR64 x <i>O. brachyantha</i>	492	43 (8.7)	6	0
	IR64 x <i>O. rufipogon</i>	138	16 (11.6)	11	8 (72.7)
	IR64 x <i>O. rhizomatis</i>	116	2 (2.3)	2	1 (50)
	IR64 x <i>O. minuta</i>	383	22 (5.7)	19	11 (53.2)
	IR64 x <i>O. alta</i>	231	15 (6.5)	14	1 (7.1)
2.	Pandanwangi x <i>O. officinalis</i>	77	13 (16.9)	11	5 (45.5)
	Pandanwangi x <i>O. australiensis</i>	140	14 (10)	14	6 (42.9)
	Pandanwangi x <i>O. grandiglumis</i>	60	24 (40)	20	18 (90)
	Pandanwangi x <i>O. punctata</i>	49	11 (22.4)	11	2 (18..2)
3.	Cisadane x <i>O. officinalis</i>	298	20 (6.7)	20	0
	Cisadane x <i>O. australiensis</i>	515	81 (15.7)	60	1 (1.7)
	Cisadane x <i>O. grandiglumis</i>	428	95 (22.2)	72	17 (23.6)
	Cisadane x <i>O. punctata</i>	78	20 (25.6)	18	2 (11.1)
	Cisadane x <i>O. brachyantha</i>	560	15 (2.7)	13	1 (7.7)
	Cisadane x <i>O. rufipogon</i>	85	5 (5.9)	3	0
	Cisadane x <i>O. rhizomatis</i>	133	6 (7.2)	5	1 (20)
4.	Memberamo x <i>O. australiensis</i>	77	13 (16.9)	11	5 (45.5)
	Memberamo x <i>O. latifolia</i>	140	14 (10)	14	6 (42.9)
	Memberamo x <i>O. rufipogon</i>	60	24 (40)	20	18 (90)
	Memberamo x <i>O. rhizomatis</i>	49	11 (22.4)	11	2 (18..2)
	Memberamo x <i>O. alta</i>	298	20 (6.7)	20	0

Sumber : Abdullah dan Hanarida (1995); Hanarida dan Rodiyah (2000).

Rekayasa Genetik

Teknik bioteknologi lainnya yang dapat diaplikasikan untuk menunjang pemuliaan padi adalah rekayasa genetik melalui transformasi gen. Teknologi ini diperlukan untuk perbaikan tanaman, khususnya bila tidak ditemukan sumber ketahanan di dalam koleksi plasma nutfah maupun kerabat liarnya. Beberapa sumber gen ketahanan terhadap hama telah dapat diisolasi dari organisme lain dan dapat disisipkan ke genom tanaman dengan transformasi secara langsung (mikroprojektil bombardment) maupun tidak langsung (*Agrobacterium tumefaciens*). Gen *cry* (Bt) yang diisolasi dari *Bacillus thuringiensis* memiliki kemampuan membentuk kristal yang bersifat toksik terhadap penggerek batang golongan Lepidoptera (Wunn *et al.*, 1996).

Penelitian transformasi telah dilakukan pada tanaman padi untuk memperoleh tanaman yang tahan terhadap hama penggerek batang padi kuning (*Scirpophaga incertulas* Wlk. *Lepidoptera*) menggunakan teknik mikroprojektil (Fauquet *et al.*, 1996). Kalus embriogenik yang berasal dari embrio tua padi Taipei 309 (Japonica), Bengawan Solo (Indica), Asemandi dan Rojolele (Javanica) digunakan sebagai eksplan. Sebelum penembakan eksplan diperlakukan pada media osmotikum manitol dan sorbitol. Plasmid yang digunakan adalah pSBB dan pUBB yang berisi gen *cryIAb*, pUBC yang berisi gen *cryIAC* dan sebagai gen marker digunakan pRQ6 (*gus*, *hpt*) atau pBar. Penembakan menggunakan sistem ko-transformasi 4:1 untuk gen target dan gen marker. Eksplan yang sudah ditransformasi ditumbuhkan pada media seleksi higromisin atau basta. Beberapa hasil penelitian disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Generasi awal (To) hasil transformasi dengan pUBB, pSBB, dan pUBC.

Varietas	Plasmid	Kalus ditembak	Kalus tahan pada medium seleksi *	Kalus diregenerasi	Jumlah tanaman
Taipei 309	pUBB	438	70 (16%)	40	91
	pSBB	170	68 (40%)	52	24
	pUBC	312	129 (41.4%)	117	57
Asemandi	pUBB	468	69 (14.7%)	57	49
	pSBB	88	5 (5.7%)	5	0
	pUBC	190	69 (36.3%)	69	24
Rojolele	pUBB	438	24 (5.5%)	24	0
	pSBB	165	22 (13.3%)	22	0
	pUBC	340	47 (13.8%)	43	0
Bengawan Solo	pUBB	508	9 (1.8%)	1	0
	pUBC	235	96 (40.8%)	79	0

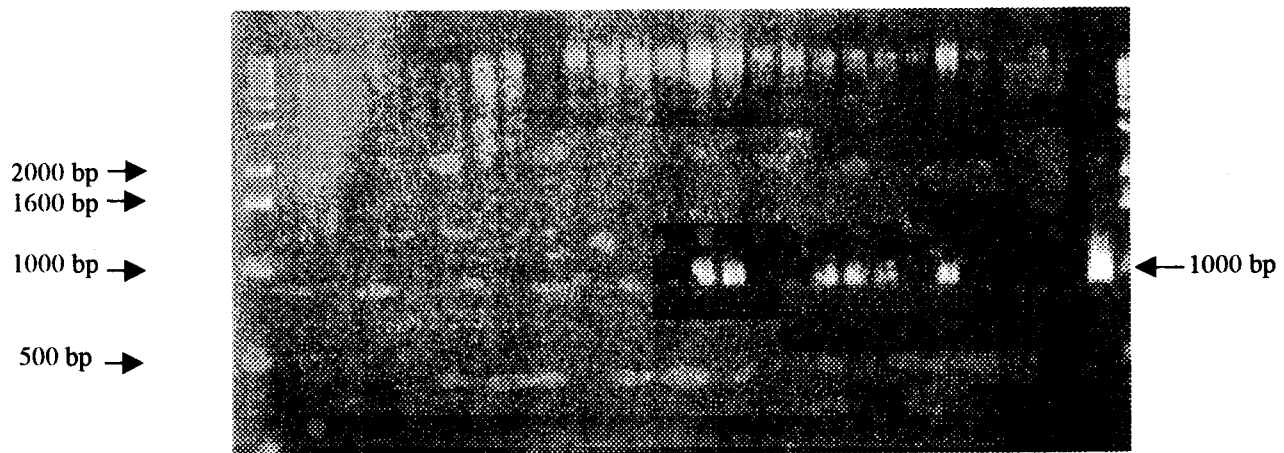
* higromisin 40 m/l

Sumber : Hanarida *et al.* (2000).

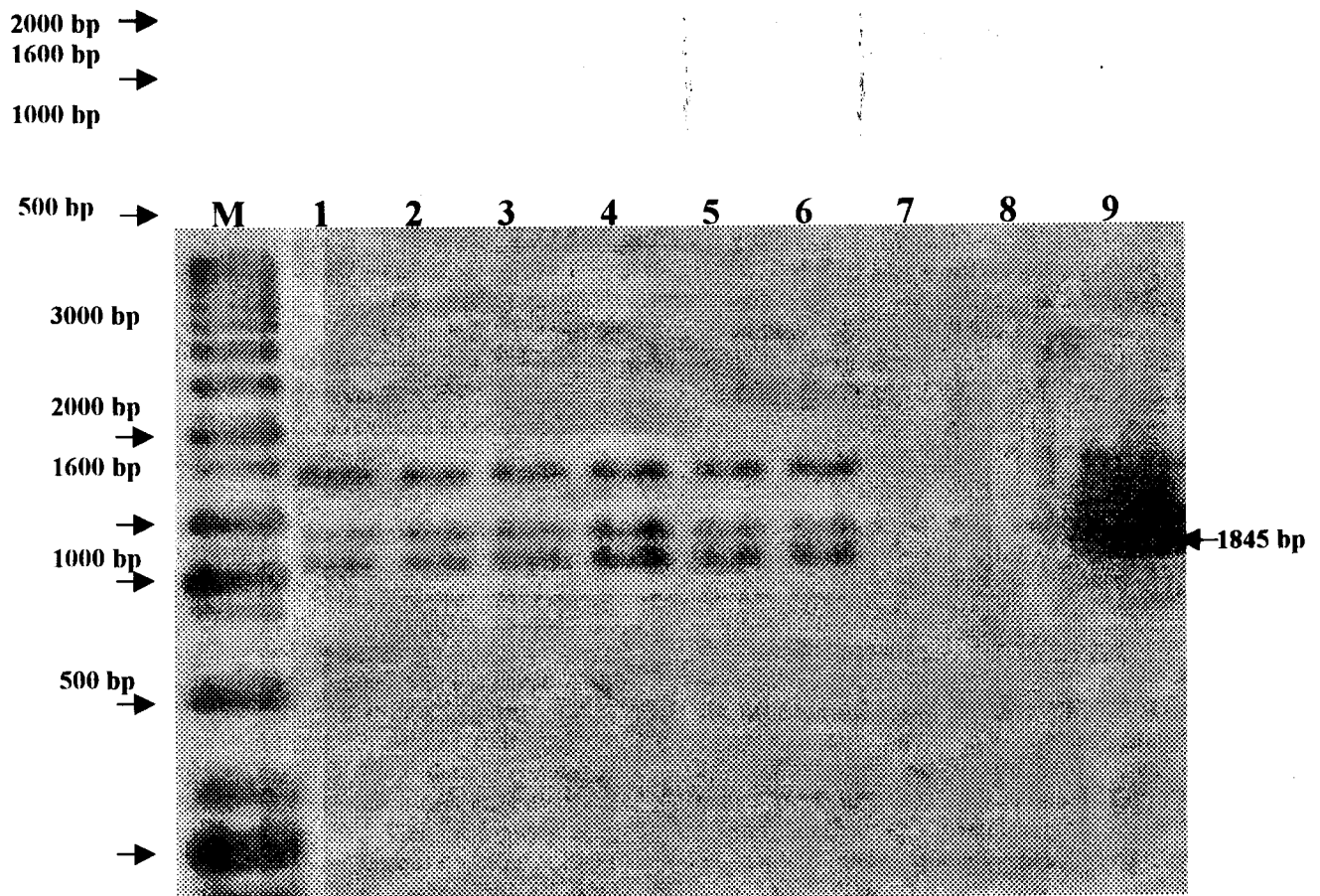
Transformasi pada Taipei 309 menggunakan ketiga plasmid pUBB, pSBB dan pUBC menghasilkan 172 tanaman putativ transgenik. Sedangkan pada padi Javanica Asemandi menghasilkan 73 tanaman yang diperkirakan mengandung gen *cryIAb* atau *cryIAC*. Rojolele hanya menghasilkan kalus dengan spot hijau (green spots) tetapi belum bisa beregenerasi membentuk tanaman. Ketika dilakukan terhadap varietas Bengawan Solo (Indica), hanya diperoleh kalus transforman (1-40%). Terlihat bahwa dari empat varietas yang digunakan memberikan respon yang berbeda. Menurut Ambarwati (1993) masalah yang sering dihadapi dalam meregenerasikan kalus adalah perbedaan tingkat embriogenik kalus dan genotip yang digunakan. Disamping itu, proses transformasi dapat juga menurunkan kemampuan atau daya regenerasi.

Dari tanaman putativ transgenik yang diperoleh, perlu dilakukan pengujian molekuler untuk melihat ada

tidaknya (integrasi) gen *cry* pada genom tanaman. Identifikasi pada jaringan tanaman yang tertransformasi dapat dilakukan dengan beberapa teknik, diantaranya adalah PCR dan analisis Southern Blot (Chee *et al.*, 1991). Dari 24 tanaman Taipei 309 yang diuji, diperoleh 6 tanaman yang positif mengandung gen *cryIAb* (Gambar 1), yang ditandai dengan terbentuknya pita DNA dengan ukuran seperti yang diharapkan (1000 bp). Lebih lanjut, identifikasi transgen perlu dilakukan menggunakan analisis Southern Blot untuk mengetahui informasi jumlah kopi gen target. Hasil hibridisasi Southern Blot dari 6 sampel tanaman yang telah positif pada pengujian PCR ditampilkan pada Gambar 2. Terlihat bahwa 6 tanaman yang diuji juga menunjukkan hasil positif pada pengujian Southern Blot dengan terbentuknya 3 pita DNA.



Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR I untuk deteksi gen *cryIAb* dari DNA tanaman padi putatif transgenik dan tanaman kontrol (cv. Taipei 309)
 M = 1 Kb ladder, 1-24 = tanaman putatif transgenik, 25-26 = tanaman tidak ditransformasi, 27 = kontrol positif (plasmid pSBB)



Gambar 2. Analisis Southern Blot dengan enzim *EcoRI* dan *BamHI*, DNA berisi gen *cryIA(b)* dan tanaman transgenik. M = 1 kb ladder, baris 1-6 = tanaman transgenik, baris 7-8 = tanaman yang tidak ditransformasi, baris 9 = kontrol positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, A.D. 1993. Regenerasi tanaman padi javanica, indica, dan japonica. Dalam S. Brotonegoro dkk (eds.). Prosiding Lokakarya Penelitian Komoditas dan Studi Khusus. 1992. Vol. II : 746-756. AARP, Badan Litbang Pertanian bekerjasama dengan Dirjen DIKTI.
- Brar, D.S. 1990. Wide hybridization : potentials in rice improvement. RBTW 1 Oct-23 Nov. 1990. International Rice Research Institute. Los Banos. Philippines.
- Brar, D.S. 1991. Wide hybridization for rice improvement. Second Rice Biotechnology Training Course. 15 Oct – 27 Nov. 1991. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.
- Chee, P.P., R.F. Drong, J.L. Slightom. 1991. Using polymerase chain reaction to identify transgenic plants. Plant Mol. Biol. Manual. 3: 1-28.
- Dewi, I.S., I. Hanarida, S. Rianawati. 1996. Anther culture and its application for rice improvement program in Indonesia. Indonesian Agric. & Dev. Journal 18 (3) : 51-56.
- Fauquet, C.M., S. Zhang, L. Chen, P. Marmey, de Kochko, R. N. Beachy. 1996. Biolistic transformation of rice : now efficient and routine for japonica and indica rice. pp : 153-165. In G.S. Khush (ed.). Proceeding of the 3rd International Rice Genetics Symposium. 16-20 October 1995. Manila, Philippines.
- Hanarida, I. 1997. Eksplorasi markah molekuler toleran keracunan besi (Fe) pada tanaman padi. Laporan tahun II RUT. RUT 1995/96. DRN, Bappenas, LIPI, BPPT.
- Hanarida, I.S., S. Rianawati. 1996. Kultur antera pada padi F1 silangan-silangan padi unggul untuk memperoleh padi tahan terhadap keracunan besi. Laporan RUT III. DRN, Bappenas, LIPI, BPPT.
- IRRI, 1991. Wide hybridization protocol. Second Rice Biotechnology Training Course. 15 Oct – 27 Nov. 1991. International Rice Research Institute, Los Banos, Philippines.
- Karim, N.H. 1987. Regeneration of anther-derived calli. IRRn 12(2) : 26.
- Khush, G.S. 1990. Rice Cytogenetics. RBTW 1 Oct-23 Nov. 1990. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.
- Kobayashi, N., R. Ikeda, D.A. Vaughan. 1994. Screening wild species of rice (*Oryza* spp) for resistance to rice tungro disease. JARQ 28: 230-236.
- Masyhudi, M.F. 1992. Effect of plant genotypes on callus formation and plant regeneration of indica, japonica, and javanica. Penelitian Pertanian Vo. 12 (2) : 55-59.
- Masyhudi, M.F., A.D. Ambarwati, Suwarno. 1997. Kemampuan regenerasi tanaman pada kultur antera beberapa varietas padi lahan pasang surut dan rawa. Journal Bioteknologi Pertanian, Vol. 2. No. 1. pp : 1-8.
- Nezu, M., T.C. Katayama, H. Kihara. 1960. Genetic study of genus *Oryza*. Crossability and chromosomal affinity among 17 species. Seiken Zihō 11: 1-11.
- Niizeki, H., K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plants from anther culture. Proc. Japan Acad. 44: 554-557.
- Purwoko, B.S., I.S. Dewi, A. Mufida. 1997. Pengaruh poliamin terhadap kultur antera padi. Poster dipresentasikan pada Seminar and Kongres Perhimpunan Bioteknologi Pertanian I. Surabaya, 13-17 Maret 1997.
- Reddy, V.S., S. Leelavathi, S.K. Sen. 1985. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plantlet regeneration in anthers of *Oryza sativa*. Physiol. Plant 63: 309-314.
- Suhartini, T., I. Hanarida, I. S. Dewi, S. Rianawati, Allidawati, Suwarno. 1997. Perbaikan genetik padi rawa pasang surut melalui kultur antera. Laporan Hasil Penelitian APBN 1996/97. Balitibo, Bogor. 14 hlm.
- Suwarno. 1996. Perbaikan varietas padi rawa pasang surut melalui kultur anter. Laporan Tahun Pertama APBN 1996/97. Kelti Sumber Daya Genetik, Balitbio, Bogor.
- Wunn, J., A. Kloti, P.K. Burkhardt, G. Biswas, K. Lauris, V.A. Iglesias, I. Ptrylens. 1996. Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. Bio/Technology 14: 171-176.
- Zapata, F.J. 1990. Tissue culture techniques. RBTW 1 Oct – 23 Nov. 1990. Internat. rice Res. Inst. Los Banos, Philippines.