

Optimasi Konsentrasi Asetosiringon dan Higromisin dalam Transformasi Genetik Padi Fatmawati dengan Perantara *Agrobacterium tumefaciens*

Optimization of Acetosyringone and Hygromycin on Genetic Transformation of Rice cv. Fatmawati Mediated by Agrobacterium tumefaciens

Atmitri Sisharmini^{1,2}, Bambang Sapta Purwoko^{3*}, Nurul Khumaida³, dan Kurniawan Rudi Trijatmiko²

¹Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor

²Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan

Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

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

Diterima 9 Januari 2018/Disetujui 10 Agustus 2018

ABSTRACT

Protocols for genetic transformation of rice have been widely developed, however the protocols are not universal and inapplicable for all types of rice plants directly. Transformation protocol on rice cv. Fatmawati needs to be developed to generate transgenic lines. The present research was carried out to optimize genetic transformation protocol in rice cv. Fatmawati mediated by *Agrobacterium tumefaciens* harboring pCambia1301 construct using immature embryo as an explant. The experiment was arranged in a completely randomized design. Factors influencing efficiency of transformation, i.e., sensitivity of callus to hygromycin antibiotic, acetosyringone concentration used in cultivation medium, hygromycin concentration for transformant selection were optimized. The results showed that genetic transformation of rice cv. Fatmawati mediated by *A. tumefaciens* using immature embryos have been successfully carried out with several parameters. Addition of 100 μM acetosyringone in co-cultivation medium and 30 mg L^{-1} hygromycin for transformant callus selection were optimal for genetic transformation of rice cv. Fatmawati mediated by *A. tumefaciens*. Transformation efficiency was found to be 7.84% based on the lines carrying the hpt gene. This result would be a valuable reference in genetic transformation of rice cv. Fatmawati using target genes.

Keywords: immature embryo, *Oryza sativa*, pCambia1301, transformation efficiency

ABSTRAK

Protokol transformasi genetik tanaman padi telah banyak dihasilkan, namun protokol tersebut bersifat tidak universal dan tidak dapat diadopsi untuk semua jenis tanaman padi secara langsung. Studi transformasi pada padi Fatmawati perlu dipelajari untuk memperbesar peluang didapatkannya tanaman transgenik. Eksplan embrio muda merupakan eksplan yang paling responsif untuk ditransformasi. Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimasi metode transformasi genetik padi Fatmawati yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa plasmid pCambia1301 dengan menggunakan embrio muda sebagai eksplan. Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap. Faktor yang mempengaruhi efisiensi transformasi pada padi yaitu tingkat kepekaan kalus padi terhadap higromisin, konsentrasi asetosiringon yang digunakan dalam media kokultivasi, dan konsentrasi antibiotik higromisin untuk seleksi kalus transforman dioptimasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi genetik padi Fatmawati yang dimediasi dengan *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan eksplan embrio muda telah berhasil dilakukan dengan beberapa parameter. Penggunaan senyawa asetosiringon 100 μM pada media kokultivasi dan antibiotik higromisin 30 mg L^{-1} untuk menyeleksi kalus transforman merupakan konsentrasi yang terbaik untuk transformasi genetik padi Fatmawati menggunakan *A. tumefaciens*. Efisiensi transformasi yang diperoleh adalah sebesar 7.84% yang didasarkan pada galur yang positif mengandung gen hpt. Hasil penelitian ini dapat menjadi acuan dalam transformasi genetik padi Fatmawati menggunakan gen target.

Kata kunci: efisiensi transformasi, embrio muda, *Oryza sativa*, pCambia1301

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: bspurwoko@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

Rekayasa genetik tanaman telah menjadi salah satu strategi penting dalam pemuliaan tanaman modern berbasis bioteknologi. Produksi tanaman transgenik merupakan proses rutin yang telah dilakukan dan diterapkan pada beberapa spesies tanaman. Gen-gen yang diintroduksi ke tanaman menyandikan sifat-sifat penting seperti perbaikan kualitas tanaman, ketahanan terhadap hama dan penyakit. Upaya perbaikan dalam mengembangkan metode transformasi yang baru dan lebih efisien sudah banyak dilakukan (Ozawa, 2009; Saika dan Toki, 2010; Sahoo *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2015).

Regenerasi tunas transforman merupakan kendala utama dalam transformasi genetik padi sehingga memerlukan sistem kultur jaringan yang efisien dan optimal (Sahoo *et al.*, 2011). Ketersediaan jaringan target yang kompeten, metode introduksi DNA ke dalam sel, prosedur dalam menyeleksi dan meregenerasikan sel-sel transforman merupakan faktor-faktor yang penting dalam sistem transformasi (Sah *et al.*, 2014). Kombinasi antara protokol regenerasi dan transformasi yang tepat dan optimal akan menentukan keberhasilan mendapatkan tanaman padi transgenik. Protokol regenerasi dan transformasi genetik tanaman padi telah banyak dihasilkan, namun protokol tersebut bersifat tidak universal dan tidak dapat diadopsi untuk semua jenis tanaman padi secara langsung (Hiei dan Komari, 2008; Tie *et al.*, 2012). Kemampuan regenerasi dan efisiensi transformasi genetik pada padi dipengaruhi oleh genotipe, umur dan jenis eksplan, media dasar, kombinasi hormon tumbuh, periode dan kondisi kultur (Sahoo dan Tuteja, 2012; Vennapusa *et al.*, 2015). Oleh karena kemampuan regenerasi tanaman dipengaruhi genotipe, sehingga kadang-kadang memerlukan manipulasi *in vitro* yang berbeda untuk genotipe yang berbeda. Metode kultur jaringan dari sel-sel non transforman merupakan syarat utama didapatkannya protokol transformasi yang efisien, sehingga dapat digunakan sebagai acuan dalam optimasi transformasi genetik tanaman (Hiei *et al.*, 2014).

Diantara teknologi transformasi genetik lainnya, transformasi yang dimediasi oleh *Agrobacterium* lebih banyak dipilih karena tekniknya relatif lebih mudah dan murah. Sistem transformasi padi yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* merupakan transformasi yang paling umum digunakan, karena mempunyai jumlah salinan gen yang relatif rendah dan stabil dengan sedikit pengaturan kembali jika dibandingkan dengan metode transfer DNA secara langsung seperti penembakan partikel (Nyaboga *et al.*, 2014). Embrio muda merupakan eksplan yang mempunyai kompetensi regenerasi dan efisiensi yang tinggi dalam transformasi padi (Hiei dan Komari, 2008).

Fatmawati merupakan varietas padi unggul tipe baru yang dilepas oleh Balitbangtan pada tahun 2003. Karakteristik padi Fatmawati adalah mempunyai hasil tinggi sekitar 7.5 ton ha⁻¹. Agak tahan terhadap wereng coklat biotipe 2 dan 3, tahan terhadap hawar daun bakteri strain III dan agak tahan terhadap strain IV. Kelemahan padi Fatmawati adalah tidak tahan blas dan mempunyai sterilitas spikelet yang tinggi ($\geq 50\%$ gabah hampa) (Abdullah *et al.*,

2008). Pengembangan padi ini menjadi varietas baru dengan karakter-karakter yang lebih unggul mempunyai potensi yang sangat tinggi melalui rekayasa genetik.

Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan metode transformasi tanaman padi Fatmawati dengan menggunakan embrio muda sebagai eksplan. Beberapa faktor yang mempengaruhi efisiensi transformasi dipelajari dalam transformasi padi Fatmawati, yaitu mengenai pengujian tingkat kepekaan kalus padi terhadap higromisin, konsentrasi asetosiringon yang digunakan dalam media kokultivasi dan konsentrasi higromisin minimal untuk seleksi kalus transforman. Dengan mempelajari faktor-faktor yang mempengaruhi transformasi diharapkan kondisi transformasi yang optimal untuk padi Fatmawati dapat diperoleh sehingga protokol ini dapat digunakan untuk transformasi selanjutnya dengan menggunakan gen target.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Eksplan

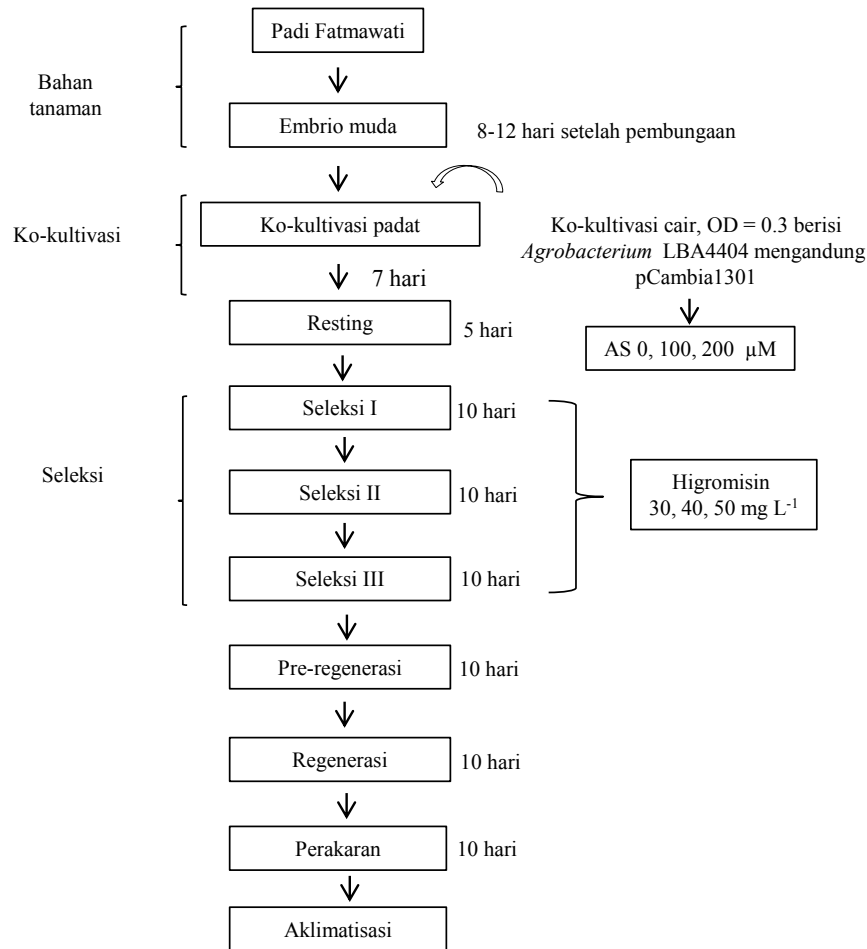
Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian pada tahun 2016. Bahan penelitian yang digunakan adalah *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung konstruk pCAMBIA1301 dan tanaman padi varietas Fatmawati sebagai sumber eksplan. Metode transformasi yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada protokol Slamet-Loedin *et al.* (2014) dengan menggunakan embrio muda sebagai eksplan (Gambar 1).

Embrio muda diisolasi dari biji-biji muda padi (berumur 8-12 hari setelah pembungaan) yang telah dibuang kulit gabahnya dan disterilisasi dengan 70% ethanol selama 5-10 detik dan larutan 1% *sodium hypochlorite* selama 5 menit. Embrio muda diisolasi dari biji menggunakan pinset.

Pengujian Tingkat Kepekaan Kalus Padi Fatmawati terhadap Higromisin

Percobaan pendahuluan dilakukan untuk menguji tingkat kepekaan kalus terhadap higromisin. Bahan berupa kalus yang berumur 7 hari yang ditumbuhkan pada media induksi kalus. Media induksi kalus yang digunakan adalah media dasar makro N6 (Chu *et al.*, 1975) dengan penambahan mikro B5 dan vitamin B5 (Gamborg *et al.*, 1968), *casamino acid* 500 mg L⁻¹, L-prolin 500 mg L⁻¹, sukrosa 30 g L⁻¹, 2,4-D 2 mg L⁻¹, BAP 1 mg L⁻¹ dan NAA 2 mg L⁻¹. Kalus yang berumur 7 hari diseleksi pada media seleksi yaitu media induksi kalus yang ditambah dengan antibiotik higromisin.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsentrasi higromisin yang ditambahkan pada media induksi kalus yaitu 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 mg L⁻¹. Jumlah kalus yang diuji adalah 20 kalus untuk masing-masing perlakuan dengan empat ulangan. Data persentase kalus hidup pada media seleksi diuji menggunakan sidik ragam. Perbedaan antar perlakuan ditentukan dengan uji



Gambar 1. Bagan tahapan metode transformasi padi Fatmawati dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*

beda nyata terkecil pada taraf uji 0.01. Analisis statistik menggunakan program R versi 3.0.1.

Pengamatan dilakukan setelah kalus berumur 3 minggu di media seleksi. Kalus yang berwarna coklat kehitaman menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan kalus. Kalus hidup ditunjukkan dengan warna kalus putih kekuningan dan masih segar. Persentase kalus hidup dihitung dari jumlah kalus yang hidup dibagi dengan jumlah kalus yang ditanam pada media seleksi dan dikalikan 100%. Kisaran konsentrasi higromisin terpilih digunakan untuk menyeleksi kalus-kalus pada transformasi padi Fatmawati.

Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Asetosiringon pada Transformasi Padi Fatmawati

Transformasi genetik padi Fatmawati dilakukan dengan cara meneteskan eksplan embrio muda yang diletakkan pada media ko-kultivasi padat dengan 5 μ l media ko-kultivasi cair yang berisi kultur *Agrobacterium*. Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* sebelumnya ditumbuhkan selama 3 hari pada media AB (Chilton *et al.*, 1974) dengan penambahan 50 mg L⁻¹ kanamisin pada suhu 28 °C. Kultur bakteri di media AB dipanen dan ditumbuhkan pada media ko-kultivasi cair. Suspensi ini yang digunakan untuk infeksi embrio muda padi. Perlakuan yang diberikan adalah penambahan

asetosiringon (AS) pada media ko-kultivasi cair dan padat (Tabel 1) dengan perlakuan tanpa AS (0), 100, dan 200 μ M AS dan kerapatan bakteri pada OD = 0.3. Embrio yang telah diinfeksi bakteri diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 25 °C selama 7 hari dan selanjutnya dikulturkan pada media *resting* (Tabel 1). Eksplan dipindahkan ke media seleksi tahap pertama (Tabel 1) dan dikulturkan selama 10 hari dengan 3 kali periode subkultur. Kalus-kalus tahan dipindahkan ke media pre-regenerasi (Tabel 1) dan diinkubasi selama 10 hari. Kalus-kalus yang berproliferasi dengan spot hijau dikulturkan pada media regenerasi yang mengandung 30 mg L⁻¹ higromisin dan 250 mg L⁻¹ cefotaksim. Tunas yang muncul dikulturkan pada media perakaran yang mengandung 40 mg L⁻¹ (Gambar 2). Planlet yang terbentuk selanjutnya diaklimatisasi dan dipindahkan ke pot berisi media tanah dan ditumbuhkan sampai panen di rumah kaca.

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap. Perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsentrasi asetosiringon yaitu tanpa penambahan AS (0), 100, dan 200 μ M. Jumlah embrio muda yang diuji adalah 32 buah untuk masing-masing perlakuan dengan empat ulangan. Data persentase pembentukan kalus hidup di media induksi di lakukan uji sidik ragam. Perbedaan antar perlakuan ditentukan dengan

Tabel 1. Komposisi media yang digunakan untuk transformasi genetik padi Fatmawati (Slamet-Loedin *et al.*, 2014)

Media	Komposisi
Kokultivasi cair	AA dengan penambahan 876 mg L ⁻¹ L-glutamin, 260 mg L ⁻¹ aspartic acid, 174 mg L ⁻¹ arginin, 0.086 g L ⁻¹ glisin, 500 mg L ⁻¹ casamino acid, 20 g L ⁻¹ sukrosa dan 10 g L ⁻¹ glukosa, pH 5.4.
Kokultivasi padat	NB dengan penambahan 500 mg L ⁻¹ casamino acid, 500 mg L ⁻¹ L-prolin, 20 g L ⁻¹ sukrosa, 10 g L ⁻¹ glukosa, 2 mg L ⁻¹ 2.4-D, 1 mg L ⁻¹ BAP, 2 mg L ⁻¹ NAA, 5.5 g L ⁻¹ Agarose tipe I, pH 5.4.
Resting	NB dengan penambahan 500 mg L ⁻¹ casamino acid, 500 mg L ⁻¹ L-prolin, 300 mg L ⁻¹ glutamin, 36 g L ⁻¹ manitol, 20 g L ⁻¹ maltose, 1 mg L ⁻¹ 2.4-D, 1 mg L ⁻¹ NAA, 0.2 mg L ⁻¹ BAP, 250 mg L ⁻¹ cefotaksim, 100 mg L ⁻¹ vancomisin, gelrite 5 g L ⁻¹ , pH 5.8.
Seleksi	Resting + 30 mg L ⁻¹ higromisin
Pre regenerasi	MS dengan penambahan 30 g L ⁻¹ maltose, 20 g L ⁻¹ sorbitol, 10 g L ⁻¹ agarose tipe I, 2 mg L ⁻¹ kinetin, 5 mg L ⁻¹ NAA, 250 mg L ⁻¹ cefotaksim, 100 mg L ⁻¹ vancomisin, 30 mg L ⁻¹ higromisin, pH 5.8.
Regenerasi	MS dengan penambahan 30 g L ⁻¹ sukrosa, 2 mg L ⁻¹ kinetin, 1 mg L ⁻¹ NAA, 250 mg L ⁻¹ cefotaksim, 100 mg L ⁻¹ vancomisin, 30 mg L ⁻¹ higromisin, 3 g L ⁻¹ gelrite, pH 5.8.
Perakaran	MS dengan penambahan 30 g L ⁻¹ sukrosa, 1 mg L ⁻¹ IBA, 2 g L ⁻¹ gelrite, 30 mg L ⁻¹ higromisin, pH 5.8.

Keterangan: AA = media asam amino; NB = media dasar N6 dengan penambahan mikro dan vitamin B5; MS = media dasar Murashige dan Skoog

uji beda nyata terkecil pada taraf uji 0.01. Analisis statistik menggunakan program R versi 3.0.1.

Variabel lain yang diamati pada perlakuan ini adalah jumlah embrio muda yang ditransformasi, jumlah kalus yang tumbuh pada media ko-kultivasi padat (persentase dihitung dari jumlah kalus yang tumbuh di media ko-kultivasi padat dibagi jumlah embrio yang ditransformasi dikalikan 100%), jumlah kalus yang tahan higromisin (kalus berwarna putih kekuningan) di media seleksi tahap ketiga (persentase dihitung dari jumlah kalus yang tahan higromisin di media seleksi tahap ketiga dibagi dengan jumlah embrio yang ditransformasi kemudian dikalikan 100%), jumlah kalus yang tumbuh spot hijau (persentase dihitung dari jumlah kalus yang tumbuh spot hijau dibagi dengan jumlah kalus tahan higromisin di media seleksi ketiga), efisiensi transformasi dan efisiensi regenerasi yang dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Efisiensi transformasi =

$$\frac{\text{Jumlah event mengandung gen higromisin}}{\text{Jumlah embrio yang ditransformasi}} \times 100\%$$

Efisiensi regenerasi =

$$\frac{\text{Jumlah kalus yang beregenerasi}}{\text{Jumlah kalus yang lolos seleksi antibiotik}} \times 100\%$$

Pengaruh Konsentrasi Higromisin terhadap Seleksi Kalus Padi Fatmawati

Perlakuan konsentrasi higromisin untuk menyeleksi kalus transforman terdiri atas tiga taraf konsentrasi yaitu 30, 40, dan 50 mg L⁻¹. Variabel yang diamati meliputi jumlah embrio muda yang ditransformasi, jumlah kalus tahan higromisin (warna kalus putih kekuningan) yang dihitung dari jumlah kalus yang hidup di media seleksi tahap ke tiga, jumlah kalus dengan spot hijau yang dihitung

dari jumlah kalus yang muncul spot-spot hijaunya, jumlah kalus beregenerasi yang dihitung dari jumlah kalus yang dapat beregenerasi menghasilkan tunas, efisiensi regenerasi, efisiensi transformasi dan jumlah galur positif PCR yang dihitung dari jumlah galur independen yang positif mengandung gen ketahanan antibiotik *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ketika dideteksi dengan teknik PCR.

Analisis Molekuler Galur Padi Putatif Transgenik Menggunakan Teknik PCR

Analisis molekuler dengan PCR dilakukan untuk mendeteksi keberadaan gen pada tanaman padi transforman. Isolasi DNA genom padi dilakukan dengan menggunakan metode CTAB (Murray dan Thompson, 1980). Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan sepasang primer spesifik untuk gen marka seleksi *hpt* (Apriana *et al.*, 2011). Reaksi PCR dilakukan pada volume total 20 ul yang terdiri atas ddH₂O, 1 x buffer PCR (10 x), 200 µM dNTPs (10mM), 0.25 µM primer Forward (5 µM), 0.25 µM primer Reverse (5 µM), 1 U Taq DNA Pol (5U µL⁻¹), dan cetakan DNA. Program PCR yang digunakan ialah tahap denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 5 menit, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94 °C selama 60 detik, annealing pada suhu 60 °C selama 45 detik dan elongasi pada suhu 72 °C selama 60 detik. Hasil PCR kemudian diseparasi pada gel agarose 1% dengan voltase 100 watt selama 1 jam dan diwarnai dengan ethidium bromida. Pengamatan dilakukan di bawah sinar UV dengan bantuan perangkat chemidoc. Pengamatan hasil PCR berdasarkan ada atau tidaknya pita DNA. PCR memberikan hasil positif jika pita DNA amplikon berukuran sama dengan kontrol plasmid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Tingkat Kepekaan Kalus Padi terhadap Higromisin

Gen yang menyandi ketahanan terhadap antibiotik higromisin (*hpt*) merupakan marka seleksi yang efisien digunakan dalam transformasi padi (Hiei dan Komari, 2008). Tingkat kepekaan kalus terhadap higromisin dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi lethal minimum higromisin terhadap kalus transforman. Informasi ini sangat berguna untuk menentukan konsentrasi higromisin yang ditambahkan pada media untuk menyeleksi kalus transforman. Konsentrasi lethal minimum agen seleksi mungkin berbeda di antara genotipe tanaman. Menurut Tran dan Mishra (2015), efektivitas seleksi dengan antibiotik tergantung pada spesies tanaman, kultivar, jenis jaringan, organ maupun perbedaan tahapan perkembangan tanaman pada spesies tanaman yang sama.

Hasil uji tingkat kepekaan kalus yang berasal dari embrio muda padi Fatmawati terhadap antibiotik higromisin menunjukkan bahwa kalus masih mampu tumbuh baik mencapai 100% dan belum menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan kalus pada perlakuan tanpa higromisin dan 10 mg L⁻¹ higromisin. Kalus sedikit mengalami penghambatan pertumbuhan dengan jumlah kalus yang tahan higromisin sebesar 87.5% pada konsentrasi 20 mg L⁻¹ higromisin. Pertumbuhan kalus menunjukkan adanya penghambatan sebesar 93.75% pada konsentrasi 30 mg L⁻¹ higromisin. Penghambatan pertumbuhan kalus 100% atau tidak ada kalus yang mampu bertahan hidup pada media seleksi ditunjukkan pada konsentrasi 40 mg L⁻¹ dan 50 mg L⁻¹ higromisin (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi lethal minimum higromisin pada embrio muda padi Fatmawati terjadi pada konsentrasi 30 mg L⁻¹, karena pada konsentrasi ini sudah mulai menunjukkan penghambatan pertumbuhan kalus dan hanya sekitar 6.25% kalus yang mampu bertahan hidup. Berdasarkan hasil

Tabel 2. Tingkat ketahanan kalus embrio muda padi Fatmawati tanpa ditransformasi terhadap higromisin

Konsentrasi higromisin (mg L ⁻¹)	Jumlah kalus yang diuji	Persentase jumlah kalus yang hidup pada media dengan higromisin (%)
0	20	100.00a
10	20	100.00a
20	20	87.50b
30	20	6.25c
40	20	0.00d
50	20	0.00d

Keterangan: Angka pada satu kolom yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf 1% menurut uji beda nyata terkecil

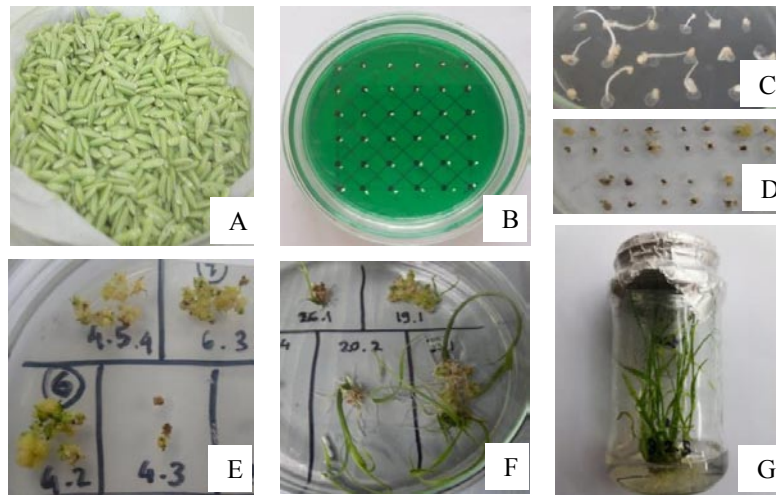
tersebut, maka konsentrasi higromisin yang dapat digunakan untuk menyeleksi kalus-kalus padi transforman adalah berkisar antara 30-50 mg L⁻¹. Kalus-kalus yang mempunyai ketahanan terhadap higromisin saja yang nantinya akan mampu bertahan hidup pada media dengan penambahan 30-50 mg L⁻¹ higromisin.

Transformasi dengan Perlakuan Perbedaan Konsentrasi Asetosiringon

Penambahan asetosiringon pada media ko-kultivasi diperlukan untuk menginduksi gen-gen vir dalam *Agrobacterium* yang berfungsi untuk memindahkan T-DNA ke dalam sel tanaman dan meningkatkan efisiensi infeksi (Nakano *et al.*, 2017). Konsentrasi asetosiringon yang tepat dapat berfungsi untuk meningkatkan efisiensi transformasi (Jia *et al.*, 2015). Namun, konsentrasi asetosiringon yang terlalu tinggi menyebabkan terjadinya nekrotik pada jaringan sehingga menyebabkan rendahnya efisiensi transformasi (Sah *et al.*, 2014).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi asetosiringon mempengaruhi persentase pembentukan kalus, kalus tahan higromisin, efisiensi regenerasi dan transformasi (Gambar 3). Persentase pembentukan kalus menunjukkan hasil yang sama antara perlakuan tanpa dan penambahan 100 µM AS, sedangkan pada perlakuan 200 µM AS menunjukkan persentase pembentukan kalus yang lebih sedikit. Persentase kalus tahan higromisin, efisiensi regenerasi dan efisiensi transformasi menunjukkan hasil yang lebih tinggi pada konsentrasi asetosiringon 100 µM dibandingkan pada media tanpa asetosiringon maupun pada konsentrasi asetosiringon 200 µM (Gambar 3). Hal ini diduga bahwa asetosiringon berperan penting dalam proses transformasi tetapi pada konsentrasi yang tinggi (200 µM) bersifat nekrotik pada sel-sel tanaman sehingga mempengaruhi pembentukan kalus. Pada konsentrasi 200 µM, perkembangan kalus terhambat dan pertumbuhan bakteri terlalu lebat menyelimuti kalus, sehingga kalus menjadi coklat (*browning*) dan akhirnya mati.

Menurut Tripathi *et al.* (2010) asetosiringon mempunyai peranan penting dalam proses transformasi. Konsentrasi asetosiringon yang digunakan pada transformasi genetik padi berbeda-beda tergantung genotipe padi yang digunakan. Konsentrasi asetosiringon 350 µM menunjukkan frekuensi transformasi paling tinggi setelah analisis uji GUS pada padi Pusa Basmati, sedangkan efisiensi transformasi yang tinggi didapatkan pada konsentrasi asetosiringon 150 µM pada padi IR64 (Sahoo dan Tuteja, 2012). Efisiensi transformasi padi Fatmawati menunjukkan persentase yang lebih tinggi pada konsentrasi asetosiringon 100 µM dibandingkan dengan asetosiringon 200 µM maupun tanpa asetosiringon. Konsentrasi asetosiringon yang tinggi menyebabkan rendahnya frekuensi regenerasi karena berkaitan dengan efek nekrotik dari senyawa tersebut (Sah *et al.*, 2014).

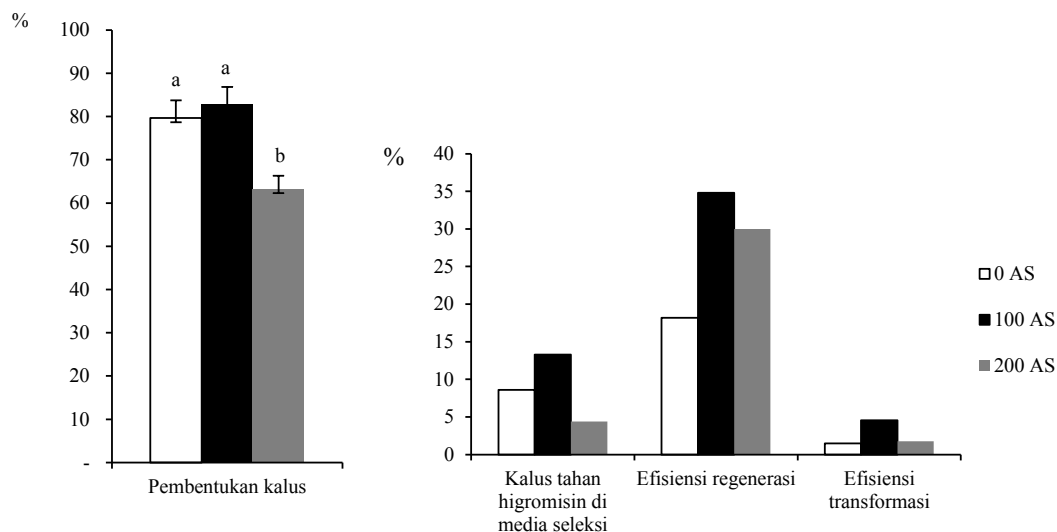


Gambar 2. Tahapan transformasi padi Fatmawati menggunakan eksplan embrio muda dengan perantara *Agrobacterium*. Eksplan biji muda padi yang akan diisolasi embrio mudanya (A), Embrio muda padi yang sudah diisolasi dan ditempatkan di media ko kultivasi (B), Embrio muda padi yang dikokultivasi dengan suspensi *Agrobacterium*, 7 hari di media ko-kultivasi (C), Kalus-kalus transforman yang tumbuh di media seleksi ketiga dengan higromisin 30 mg L⁻¹ (D), Kalus transforman dengan spot hijau (E), Tunas transforman yang tumbuh dari kalus yang tahan higromisin (F), Planlet transforman di media perakaran (G)

Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Higromisin terhadap Kalus Padi Fatmawati Setelah Transformasi

Persentase sel-sel pada kalus yang dapat ditransformasi (menerima DNA asing) relatif rendah, oleh karena itu sangatlah penting untuk menghambat perkembangan dari sel-sel non transforman (Zhu dan Wu, 2008). Penghambatan sel-sel non transforman dilakukan dengan antibiotik higromisin yang telah diketahui konsentrasi penghambatannya pada kalus padi Fatmawati yaitu pada konsentrasi 30, 40 dan 50 mg L⁻¹ (Tabel 2). Ketiga konsentrasi higromisin tersebut digunakan untuk menyeleksi kalus-kalus transforman dan melihat pengaruhnya terhadap efisiensi transformasi. Hasil menunjukkan bahwa konsentrasi 30 mg L⁻¹ higromisin menghasilkan efisiensi transformasi yang lebih tinggi yaitu sebesar 7.84% ketika dibandingkan dengan konsentrasi higromisin 40 dan 50 mg L⁻¹ (Tabel 3).

Seleksi kalus transforman pada 30 mg L⁻¹ higromisin menunjukkan bahwa semua tunas yang tahan ternyata juga mengandung gen *hpt* setelah dianalisis PCR (Tabel 3). Hal ini memberi indikasi bahwa higromisin 30 mg L⁻¹ merupakan konsentrasi terbaik untuk menyeleksi kalus transforman. Tanaman yang diregenerasikan dari kalus yang menunjukkan positif dalam analisis molekulernya merupakan sistem seleksi yang efektif (Htwe *et al.*, 2014). Konsentrasi higromisin yang lebih tinggi menunjukkan efisiensi transformasi yang lebih rendah diduga karena pada konsentrasi tersebut tingkat seleksi terhadap kalus transforman terjadi dengan ketat sehingga kemungkinan kalus-kalus yang mengandung gen ketahanan higromisin juga ikut terseleksi atau mati. Higromisin yang terlalu tinggi juga menghambat pertumbuhan dan perkembangan kalus-kalus transforman sehingga pada akhirnya kalus tersebut mati. Tran dan Mishra (2015) menyatakan bahwa adanya



Gambar 3. Pengaruh Asetosiringon (AS) terhadap persentase pembentukan kalus, kalus yang tahan higromisin di media seleksi, efisiensi regenerasi dan efisiensi transformasi

Tabel 3. Pengaruh perbedaan konsentrasi higromisin untuk seleksi kalus terhadap efisiensi regenerasi dan transformasi

Konsentrasi higromisin (mg L ⁻¹)	Jumlah EM yang ditransformasi ¹⁾ (A)	Jumlah kalus tahan higromisin (B)	Jumlah kalus dengan spot hijau	Jumlah kalus beregenerasi/galur independen (D)	Efisiensi regenerasi (%) ²⁾	Jumlah galur/planlet positif PCR (C)	Efisiensi transformasi (%) ³⁾
30	153	43	36	12	27.9	12	7.84
40	98	12	9	2	16.7	2	2.04
50	120	10	8	1	10.0	1	0.83

Keterangan: ¹⁾Embrio muda, ²⁾Dihitung dari perbandingan antara jumlah kalus yang beregenerasi dengan jumlah, kalus yang tahan higromisin (D/B) dikalikan 100%, ³⁾Dihitung dari perbandingan antara jumlah planlet dengan jumlah EM yang ditransformasi (C/A) dikalikan 100%

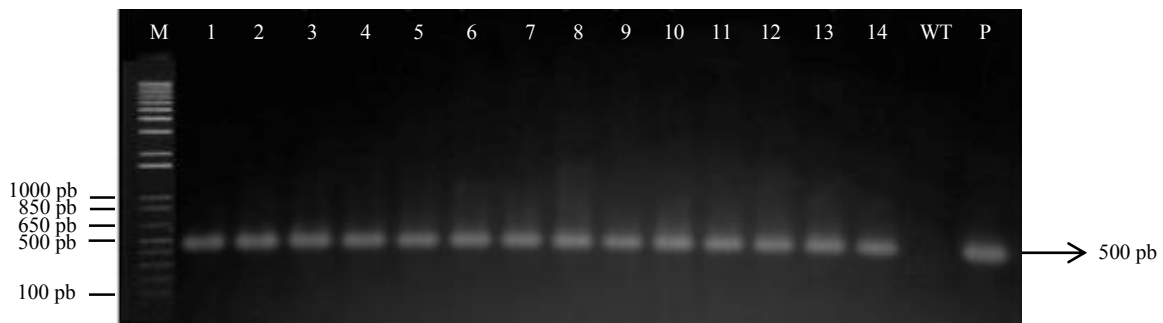
antibiotik pada level yang tinggi tidak hanya mematikan sel-sel non transforman tetapi juga akan menghambat pertumbuhan sel-sel transforman sehingga akan mempengaruhi regenerasinya. Penelitian Mulyaningsih *et al.* (2010) menggunakan konsentrasi higromisin 25 mg L⁻¹ untuk menyeleksi kalus-kalus padi Batutegei dan Kasalath. Hal ini memberi indikasi bahwa perbedaan konsentrasi higromisin untuk menyeleksi kalus transforman diduga juga bersifat tergantung genotipe.

Analisis Molekuler Galur Padi Transgenik dengan Menggunakan Teknik PCR

Galur-galur putatif padi transgenik yang dihasilkan dianalisis secara molekuler dengan teknik PCR untuk mengetahui apakah konstruk pCAMBIA1301 berhasil

diintroduksi ke padi Fatmawati. Tanaman padi putatif transgenik yang dihasilkan pada penelitian ini ialah 14 galur. Ke-14 galur tersebut kemudian diisolasi DNANYa dan dilakukan analisis PCR dengan menggunakan primer untuk gen *hpt*.

Hasil analisis PCR dari 14 galur tanaman padi Fatmawati putatif transgenik yang dihasilkan dari transformasi, menunjukkan positif mengandung gen *hpt* (Gambar 4). Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya amplicon dari gen *hpt* yang berukuran 500 bp, ukuran ini sama dengan amplicon dari kontrol plasmid pCAMBIA1301. Hasil uji PCR menunjukkan bahwa semua planlet yang lolos seleksi higromisin dengan konsentrasi 30-50 mg L⁻¹ ternyata juga positif mengandung gen *hpt* yang terdapat pada konstruk pCAMBIA1301.



Gambar 4. Hasil analisis PCR menggunakan primer gen *hpt* dari galur-galur tanaman padi Fatmawati putatif transgenik. 1 kb ladder (M), galur padi Fatmawati putatif transgenik (1-14), kontrol *wild type* (WT), kontrol plasmid pCAMBIA1301 (P)

KESIMPULAN

Varietas padi Fatmawati dapat ditransformasi dengan perantara *Agrobacterium* menggunakan eksplan berupa embrio muda. Penggunaan asetosiringon 100 μ M pada media kokultivasi dan higromisin 30 mg L⁻¹ untuk menyeleksi kalus transforman merupakan konsentrasi yang optimal untuk transformasi genetik padi Fatmawati menggunakan *A. tumefaciens* dengan efisiensi transformasi sebesar 7.84%. Metode transformasi genetik padi Fatmawati ini dapat digunakan sebagai acuan dalam transformasi selanjutnya dengan menggunakan gen target.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, B., S. Tjokrowijoyo, Sularjo. 2008. Perkembangan dan prospek perakitan padi tipe baru di Indonesia. J. Litbang Pertanian 27:1-5.
- Apriana, A., A. Sisharmini, W. Enggarini, Sudarsono, N. Khumaida, K.R. Trijatmiko. 2011. Introduksi konstruk over ekspresi kandidat gen OsWRKY76 melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman padi Nipponbare. J. Agrobiogen 7:19-27.

- Chilton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bendich, M.P. Gordon, E.W. Nester. 1974. *Agrobacterium* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71:3672-3676.
- Chu, C.C., C.C. Wang, C.S. Sun, C. Hus, K.C. Yin, C.Y. Chu. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sinica 18:659-668.
- Cho, A.R., D.K. Lee, K.M. Kim. 2015. High frequency plant regeneration from transgenic rice expressing *Arabidopsis thaliana* bax inhibitor (At BI-1) tissue cultures. J. Plant Biotechnol. 42:83-87.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, K. Ojima. 1968. Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50:151.
- Hiei, Y., T. Komari. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryo or calli induced from mature seed. Nat. Protoc. 3:824-834.
- Hiei, Y., Y. Ishida, T. Komari. 2014. Progress in cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Front Plant Sci. 5:1-11.
- Htwe, W.W., H.C. Ling, F.Q. Zaman, M. Maziah. 2014. Plant genetic transformation efficiency of selected Malaysian rice based on selection marker gen (*hptII*). Pak. J. Biol. Sci. 17:472-481.
- Jia, Y., X. Yao, M. Zhao, Q. Zhao, Y. Du, C. Yu, F. Xie. 2015. Comparison of soybean transformation efficiency and plant factors affecting transformation during the *Agrobacterium* infection process. Int. J. Mol. Sci. 16:18522-18543.
- Mulyaningsih E.S., H. Aswidinnoor, D. Sopandie, P.B.F. Ouwerkerk, I.H. Slamet-Loedin. 2010. Transformasi padi indica kultivar Batutege dan Kasalath dengan gen regulator HD-Zip untuk perakitan varietas toleran kekeringan. J. Agron. Indonesia 38:1-7.
- Murray, M.G., W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8:4321-4325.
- Nakano, Y. 2017. Effect of acetosiringone on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eustoma grandiflorum* leaf disks. JARQ. 51:351-355.
- Nyaboga, E., J.N. Tripathi, R. Manoharan, L. Tripathi. 2014. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*) : an important tool for functional study of genes and crop improvement. Front. Plant Sci. doi:10.3389/fpls.2014.00463.
- Ozawa, K. 2009. Establishment of a high efficiency *Agrobacterium* mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci. 176:522-527.
- Sahoo, K.K., A.K. Tripathi, A. Pareek, S.K. Sopory, S.L.S. Pareek. 2011. An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivar. Plant Methods 7:49.
- Sahoo, R.K., Tuteja, N. 2012. Development of *Agrobacterium*-mediated transformation technology for mature seed-derived callus tissue of Indica rice cultivar IR64. GM Crop and Food Biotechnol. in Agricult. Food Chain 3:123-128.
- Sah, S.K., A. Kaur, G. Kaur, G.S. Cheema. 2014. Genetic transformation of rice: problem, progress and prospects. J. Rice Res. 3:132.
- Saika, H., S. Toki. 2010. Mature seed derived callus of the model indica rice variety Kasalath is highly competent in *Agrobacterium* mediated transformation. Plant Cell Rep. 29:1351-1364.
- Slamet-Loedin, I.H., P. Chadha-Mohanty, L. Torrizo. 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation: rice transformation. Methods Mol. Biol. 1099:261-71.
- Tie, W., F. Zhao, L. Wang, W. Xie, H. Chen, X. Li, Y. Lin. 2012. Reason for lower transformation efficiency in indica rice using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation : lessons from transformation assays and genome-wide expression profiling. Plant Mol. Biol. 78:1-18.
- Tran, N.T., N.S. Mishra. 2015. Effect of antibiotic on callus regeneration during transformation of IR64 rice. Biotechnol. Rep. 7:143-149.
- Tripathi, R.M., H.S. Bisht, R.P. Singh. 2010. Effect of acetosyringone and callus age on transformation for scutellum-derived callus of rice. Int. J. Pharma Bio Sci. 1:163-171.
- Vennapusa, A.R., R.S. Vemanna, R. Reddy, K.C. Babitha, K. Kiranmai, A. Nareskumar, C. Sudhakar. 2015. An efficient callus induction and regeneration protocol for a drought tolerant rice indica genotype AC39020. J. Plant Sci. 3:248-254.
- Zhu, Z., R. Wu. 2008. Regeneration of transgenic rice plants using high salt for selection without the need for antibiotics or herbicides. Plant Sci. 174:519-523.