

# Menuju Perakitan Tanaman Padi Transgenik Tahan Hama Penggerek Batang

Ida Hanarida Somantri, A. Apriana, I.S. Dewi, E. Listanto,  
A.D. Ambarwati, dan T.J. Santoso

*Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor*

## ABSTRAK

Di Indonesia, penggerek batang padi (*Scirpophaga* sp., Lepidoptera) merupakan salah satu hama utama yang menyebabkan penurunan produksi padi. Padi tahan hama penggerek batang diperlukan untuk memecahkan masalah tersebut. Sumber gen ketahanan terhadap hama ini belum ditemukan pada plasma nut-fah padi. Telah diketahui bahwa gen *cry* dari *Bacillus thuringiensis* menghasilkan protein yang toksik terhadap Lepidoptera. Oleh karena itu, teknik DNA re-kombinan diperlukan untuk memperoleh padi transgenik ( $T_0$ ) tahan penggerek padi. Penelitian yang dilakukan pada tahun anggaran 1998/99, yaitu (1) transformasi padi dengan bombardemen mikroprojektil dan (2) evaluasi tanaman putative transgenik ( $T_0$ ). Pada kegiatan pertama, eksplan yang digunakan adalah kalus embriogenik dari Taipei-309, Bengawan Solo, Rojolele, dan Asemendi, sedangkan konstruksi gen yang digunakan adalah *pSBB* (35S, *cry* IA(b)), *pUBB* (ubiquitin, *cry* IA(b)), *pUBC* (ubiquitin, *cry* IA(c)), serta konstruksi gen yang mengandung markah seleksi gen Gus dan *hph* (*pRQ6*), serta markah seleksi gen Gus dan Bar (*pBar*) yang dihambat oleh promotor 35S. Metode yang digunakan adalah sistem ko-transformasi yang menggunakan perbandingan molaritas 4 : 1 untuk gen target. Pada kegiatan kedua, dilakukan evaluasi terhadap tanaman putative transgenik yang diregenerasikan dari kalus yang telah lolos seleksi uji antibiotik higromisin dan herbisida Basta<sup>R</sup>. Dari penelitian ini, telah berhasil di-regenerasikan tanaman hijau ( $T_0$ ) dari varietas Taipei-309 (118 tanaman) dan Asemendi (73 tanaman). Hasil evaluasi uji ekspresi gen Gus pada  $T_0$  yang berasal dari kalus yang ditembak dengan *pRQ6* dan *pUBB* menunjukkan bahwa 66% Taipei-309 dan 25,6% Asemendi mengekspresikan gen Gus. Saat ini, masih berlangsung evaluasi lebih lanjut pada tanaman  $T_0$  serta pengujian melalui bioasai dengan hama penggerek batang.

**Kata kunci:** Tanaman padi transgenik, gen *cry*, hama penggerek batang padi

## ABSTRACT

Rice stem borer (*Scirpophaga* sp., Lepidoptera) is considered as one of primary pests causing yield decrease in Indonesia. Rice resistant to stem borer is needed to solve this problem. Source of resistant to stem borer has not been found in rice germplasm. It is known that *cry* gene from *Bacillus thuringiensis* produced crystal protein toxic to Lepidopteran. In this case, recombinant DNA technology is required to obtain transgenic rice ( $T_0$ ) resistant to stem borer. Two activities were conducted in this research (1998/99). They were (1) rice transformation using microprojectil bombardment and (2) evaluation of putative transgenic ( $T_0$ ) plants. Materials used in the first experiment were Bengawan Solo, Rojolele, Asemendi, and Taipei-309 (control), while gene constructs used were *pSBB* (35S, *cry* IA(b)), *pUBB* (ubiquitin, *cry* IA(b)), *pUBC* (ubiquitin, *cry* IA(c)), and constructs containing marker gene Gus and *hph* (*pRQ6*), or Gus and Bar (*pBar*) under control of 35S promoter. Co-transformation system used molarity of 4 : 1 which was a comparison between construct containing gene of interest (*cry* IA gene) and the construct containing molecular marker based on their molarity. In the second experiment, plantlets

derived from calli previously in hygromycine or Basta<sup>R</sup>/biolaphos selection media were evaluated using Gus assay. 118 green plantlets (T<sub>0</sub>) were regenerated from Taipei-309 and 73 green plantlets from Asemandi. Gus gene expression of T<sub>0</sub> plants derived-calli bombarded with pRQ6/pUBB indicated that 66% of Taipei-309 and 25.6% of Asemandi were positive-containing pRQ6. The experiment is still on going to evaluated all the T<sub>0</sub> plants and perform bioassay using the stemborer.

**Key words:** Rice transgenic plant, *cry* gene, rice stemborer

## PENDAHULUAN

Penggerek batang padi yang termasuk golongan Lepidoptera merupakan salah satu hama utama yang menyebabkan kerusakan dan kerugian hasil padi di Indonesia dan beberapa negara di Asia. Kehilangan hasil akibat serangan hama ini berkisar antara 60–90% (Pathak dan Khan, 1994). Di antara enam spesies hama penggerek batang padi di Indonesia, penggerek batang padi putih (*Scirpophaga innotata* Wlk.) dan penggerek batang padi kuning (*S. incertulas* Wlk.) merupakan spesies yang dominan. Pemakaian insektisida untuk pengendalian hama ini tidak berhasil, karena larva masuk ke dalam batang padi segera setelah telur menetas dan terus berkembang melalui beberapa tahapan menjadi pupa.

Varietas unggul merupakan teknologi yang murah, mudah, dan ramah lingkungan. Oleh karena itu, varietas unggul yang tahan terhadap hama penggerek batang padi sangat diperlukan untuk mengendalikan hama tersebut. Para peneliti di India dan IRRI menduga bahwa beberapa jenis padi liar mempunyai ketahanan terhadap penggerek padi kuning (Heinrich, 1980). Hasil penelitian di Indonesia menunjukkan bahwa sifat ketahanan tersebut ternyata lebih bersifat fisik, yaitu karena ukuran batang yang kecil sehingga tidak disukai oleh hama penggerek batang (Soejitno *et al.*, 1995). Sampai saat ini belum ditemukan sumber gen ketahanan terhadap hama penggerek batang dari koleksi plasma nutfah padi.

*Bacillus thuringiensis* memproduksi kristal protein yang bersifat insektisida. Gen yang mengkode *insect specific-endotoxin* ialah gen *cry*. Produk dari gen *cry* I diketahui sangat efektif untuk mematikan hama dari golongan Lepidoptera (Wunn *et al.*, 1996; Fujimoto *et al.*, 1993). Teknik rekayasa genetika memungkinkan untuk memindahkan gen tersebut ke tanaman padi sehingga tanaman transgenik yang dihasilkan akan mempunyai ketahanan terhadap hama penggerek batang padi.

Saat ini, penggunaan mikroprojektil untuk menyisipkan gen secara langsung menjadi populer, karena sistem ini selain dapat menghasilkan ekspresi gen yang umumnya stabil pada tanaman transgenik, juga penggunaannya tidak dibatasi oleh kelas tanaman ataupun jenis eksplan tertentu (Hunold *et al.*, 1994). Menurut Birch dan Franks (1991) dengan teknik mikroprojektil, tanaman transgenik yang stabil dapat diregenerasikan walaupun digunakan dua jenis markah yang berlainan pada konstruksi gen

yang sama atau berbeda. Oleh karena itu, sistem ko-transformasi dengan menggunakan kombinasi dua buah konstruksi plasmid berlainan yang mengandung gen dan markah seleksi yang diinginkan sangat dimungkinkan.

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan tanaman padi putative transgenik generasi awal ( $T_0$ ) yang memiliki gen ketahanan terhadap hama penggerek batang.

## **BAHAN DAN METODE**

Penelitian ini terdiri dari dua kegiatan, yaitu (1) transformasi padi menggunakan mikroprojektil dan (2) evaluasi tanaman putative transgenik.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Kelti Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor pada tahun anggaran (TA) 1997/98 dan 1998/99.

### **Transformasi Padi Menggunakan Mikroprojektil**

Bahan yang digunakan adalah kalus embriogenik yang berasal dari skutelum embrio tua varietas padi yang telah diuji daya regenerasinya (Laporan ROPP 1996/97), yaitu varietas padi unggul Bengawan Solo, dua varietas lokal Asemendi dan Rojolele, serta Taipei-309 sebagai kontrol.

Konstruksi plasmid yang digunakan diperoleh dari Universitas Ottawa, Canada, melalui Dr. Illimar Altosaar, Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran. Plasmid tersebut mengandung gen yang diinginkan (gen *cry*) dengan promoter yang berlainan, yaitu *pUBB* (ubiquitin, gen *cry* IA(b)), *pUBC* (ubiquitin, gen *cry* IA(c)), *pSBB* (35S CaMV, gen *cry* IA(b)). Sebagai penanda digunakan konstruksi plasmid yang mengandung gen markah, yaitu *pRQ6* (gen Gus dan *hph*) dan *pBar* (gen Gus dan Bar).

### **Induksi Kalus**

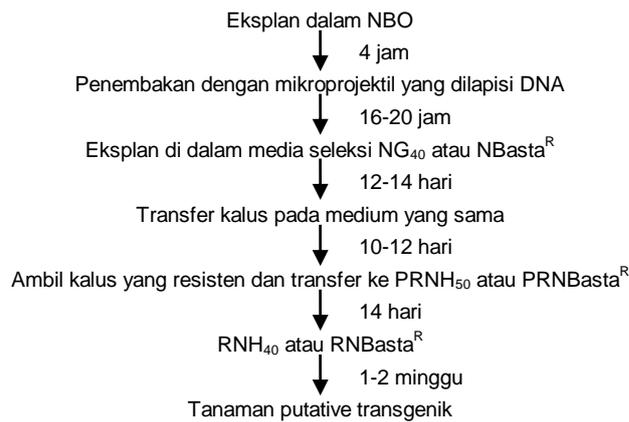
Kalus diinduksi pada medium NB (pH 5,8-5,82) yang diberi L-prolin 500 mg/l, L-glutamin 500 mg/l, kasein hidrolisat 300 mg/l, sukrosa 30 g/l, dan 2,4-D 2 mg/l.

### **Subkultur**

Kalus yang embriogenik dipindahkan ke medium baru dengan komposisi yang sama seperti pada medium induksi kalus.

### **Persiapan Kalus Embriogenik untuk Transformasi**

Kalus embriogenik hasil subkultur ditempatkan pada medium dengan osmotikum tinggi selama 4 jam sebelum penembakan. Media tersebut (NBO), yaitu media NB yang diberi tambahan manitol dan sorbitol masing-masing sebanyak 30 g/l.



**Gambar 1.** Bagan transformasi padi dengan mikroprojektil

### Transformasi dan Seleksi

Prosedur transformasi (Gambar 1) menggunakan protokol yang telah dikembangkan oleh Chen dan Zhang pada tahun 1995 dan disempurnakan oleh Fauquet *et al.* (1996). Seleksi dengan menggunakan media NB yang mengandung 40 mg/l higromisin (untuk mengetahui terjadinya ekspresi gen *hph*) atau herbisida Basta<sup>R</sup> (untuk mengetahui terjadinya ekspresi gen Bar) dilakukan pada kalus em-briogenik yang telah ditembak dengan mikroprojektil. Kalus yang dapat meregenerasikan tanaman dianggap kalus transgenik (mempunyai gen *hph* atau Bar) dan tanaman yang dihasilkan dianggap (putative) tanaman transgenik.

### Evaluasi Tanaman Putative Transgenik

Bahan tanaman yang digunakan pada penelitian ini ialah tanaman generasi awal (T<sub>0</sub>) hasil transformasi dengan mikroprojektil pada kegiatan transformasi padi menggunakan mikroprojektil.

### Uji Ekspresi Gen Gus

Uji dilakukan dengan metode Rueb dan Hensgens (1989) dalam Hiei *et al.* (1994) dengan menggunakan substrat x-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide). Sepotong daun atau akar padi direndam di dalam larutan bufer fosfat (50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 6,8 yang mengandung 1% Triton X-100) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian bufer dibuang dan diganti dengan bufer fosfat segar yang mengandung 1,0 mM X-gluc dan 20% metanol, selanjutnya divakum selama 5 menit dan diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C. Sebelum pengamatan, daun dicuci dua kali dengan 99% metanol. Uji positif bila terdapat warna biru pada eksplan yang diperlakukan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Transformasi Padi menggunakan Mikroprojektil

Prinsip dasar dari penggunaan sistem penembakan dengan mikroprojektil untuk transfer gen ialah dengan menggunakan mikroprojektil yang berkecepatan tinggi agar dapat menembus lapisan luar sel dalam rangka mengintroduksi material genetik ke dalam sel hidup (Birch dan Bower, 1994). Sel tersebut merupakan sel yang harus dapat terus hidup untuk mengekspresikan dan kadang-kadang dapat menginkorporasikan gen yang diintroduksi. Target tembakan atau eksplan yang diharapkan memproduksi tanaman transgenik harus mudah diregenerasikan dan dapat dengan mudah ditembus oleh mikroprojektil (Birch dan Franks, 1991).

Dalam penelitian ini yang digunakan sebagai target untuk ditembak adalah kalus yang berasal dari skutelum embrio. Sebelum kalus yang telah ditembak dengan mikroprojektil diregenerasikan, sebagian kalus tersebut telah diuji untuk ekspresi gen Gus sementara sesaat setelah ditembak. Uji tersebut berguna untuk menunjukkan bahwa transfer gen telah terjadi dengan dapat diidentifikasinya ekspresi gen Gus pada kalus yang baru ditembak. Uji Gus ini sekaligus dipergunakan untuk mengetahui keefisienan sistem transformasi yang digunakan (Birch dan Bower, 1994).

Sebagian kalus yang tidak diuji ekspresi gen Gusnya ditempatkan pada media (1) seleksi kalus, (2) pre-regenerasi, dan (3) regenerasi. Media seleksi kalus (media NG<sub>40</sub> atau NBasta<sup>R</sup>) merupakan media NB + 40 mg/l higromisin atau Basta<sup>R</sup>. Media ini digunakan pada tahap awal seleksi setelah kalus mengalami penembakan dengan mikroprojektil. Kalus yang mati pada media seleksi pertama merupakan kalus yang tidak tertransformasi. Media pre-regenerasi (PRNH<sub>40</sub> atau PRNBasta<sup>R</sup>) merupakan media NB + 2 mg/l BAP + 1 mg/l NAA + 5 mg/l ABA serta 40 mg/l higromisin. Dengan adanya higromisin atau Basta<sup>R</sup> pada media seleksi kedua, kalus yang *escape* dari media seleksi pertama diharapkan akan terseleksi untuk kedua kalinya pada media seleksi kedua. Media pre-regenerasi juga mempersiapkan kalus untuk beregenerasi (*conditioning*). Media regenerasi (RNH<sub>40</sub> atau RNBasta<sup>R</sup>) yang merupakan media NB + 0,8 mg/l NAA + 4 mg/l BAP dan 40 mg/l higromisin atau Basta<sup>R</sup>. Media ini diharapkan dapat meregenerasikan kalus yang lolos seleksi pada media kedua, tetapi tetap dapat mengeliminasi eksplan yang *escape* dari media kedua.

Penggunaan media seleksi secara bertahap akan menyebabkan planlet yang dihasilkan merupakan tanaman yang benar-benar telah teruji ketahanannya terhadap higromisin atau Basta<sup>R</sup>. Kedua gen penanda ketahanan tersebut (*hph* atau Bar) digunakan sebagai markah seleksi, untuk menduga keberhasilan ko-transformasi. Sistem ko-transformasi dalam penelitian ini menggunakan dua macam plasmid dengan perbandingan molaritas antara plasmid yang membawa gen markah dengan yang membawa gen *cry* sebesar 4 : 1, sehingga akan semakin besar peluang untuk

mendapatkan transforman yang mengandung gen markah. Oleh karena itu, dengan media seleksi bertahap seperti yang dilakukan pada penelitian ini, jumlah kalus yang dapat dipindahkan ke media yang baru (subkultur) tampak terus berkurang pada setiap media seleksi (Tabel 1, 2, dan 3).

Dilihat dari tanaman hijau yang diperoleh, tampak bahwa keempat varietas memberikan tanggap yang berbeda walaupun kondisi pre-penembakan dilakukan dengan cara yang sama (Tabel 1, 2, dan 3). Tabel tersebut menunjukkan bahwa tanaman yang diperoleh umumnya lebih sedikit dibandingkan dengan jumlah kalus yang lolos seleksi pada media regenerasi. Selain akibat media seleksi, hal ini juga dapat disebabkan oleh berbagai faktor lain, tetapi yang sering dihadapi dalam meregenerasikan kalus ialah perbedaan tingkat embriogenik kalus yang digunakan sebagai eksplan serta perbedaan genotipe yang digunakan. Hal serupa juga diamati oleh Ambarwati (1993) yang meneliti pembentukan tanaman dari kalus skutelum embrio padi varietas Taipei-309, IR64, dan Rojolele. Semua eksplan pada penelitian itu dapat diinduksi menjadi kalus pada berbagai media yang mengandung hormon auksin dan kinetin yang seimbang, tetapi selanjutnya tanaman hanya dapat diregenerasikan dari kalus Taipei-309 dan IR64 saja.

**Tabel 1.** Tanaman padi transgenik awal ( $T_0$ ) transformasi dengan  $pRQ6/pUBB$ 

TA	Varietas	JKT	JKLS			THij	TAlb
			NH <sub>40</sub>	PRNH <sub>40</sub>	RNB		
I	Taipei-309	198	198	41	16	1	0
II		240	240	29	24	90	1
I	Asemandi	218	218	12	12	0	0
II		250	259	57	45	49	5
I	Bengawan Solo	273	243	8	1	0	0
II		235	235	1	0	0	0
I	Rojolele	195	195	14	14	0	0
II		243	243	10	10	0	1

TA = tahun anggaran, I = tahun anggaran 1997/98, II = tahun anggaran 1998/99, JKT = jumlah kalus yang ditembak, JKLS = jumlah kalus lolos seleksi pada media dengan 40 g/l higromisin, THij = tanaman hijau, TAlb = tanaman albino

**Tabel 2.** Tanaman padi transgenik awal ( $T_0$ ) hasil transformasi dengan  $pRQ6/pSBB$ 

Varietas	JKT	JKLS				THij	TAlb
		NH <sub>40</sub>	PRNH <sub>40</sub>	RNB	NK <sub>2</sub> N <sub>0,5</sub>		
Taipei-309	170	1700	68	48	4	24	3
Asemandi	88	88	5	3	2	0	0
Rojolele	165	165	22	22	0	0	0

JKT = jumlah kalus yang ditembak, JKLS = jumlah kalus lolos seleksi pada media dengan 40 g/l higromisin, THij = tanaman hijau, TAlb = tanaman albino

**Tabel 3.** Tanaman padi transgenik awal ( $T_0$ ) hasil transformasi dengan  $pBar/pUBC$ 

Varietas	JKT	JKLS			THij
		NBasta <sup>R</sup>	RNB	NK <sub>2</sub> N <sub>0,5</sub>	
Taipei-309	52	52	52	7	0
Asemandi	70	70	60	22	24
Rojolele	130	130	0	0	0
Bengawan Solo	50	50	0	0	0

JKT = jumlah kalus yang ditembak, JKLS = jumlah kalus lolos seleksi pada media dengan 5 ppm Basta<sup>R</sup>, THij = tanaman hijau

Tabel 1 menunjukkan bahwa pada penelitian TA 1998/99, jumlah tanaman hijau yang dapat diregenerasikan pada varietas Taipei-309 meningkat 90 kali lipat bila dibandingkan dengan penelitian pada TA 1997/98. Dengan menggunakan jumlah kalus awal yang relatif sama (198 dan 240 kalus) dapat dihasilkan 90 tanaman hijau dan satu tanaman albino pada TA 1998/99 dan hanya satu tanaman hijau pada tahun 1997/98. Demikian juga pada varietas Asemandi yang pada tahun sebelumnya tidak berhasil diregenerasikan, pada tahun 1998/99 telah berhasil diregenerasikan sebanyak 49 tanaman hijau dan lima tanaman albino. Dengan menggunakan plasmid yang berbeda, yaitu  $pRQ6/pSBB$  hanya dapat dihasilkan 24 tanaman hijau dan tiga tanaman albino dari varietas Taipei-309 (Tabel 2), sedangkan pada

penggunaan *pBar/pUBC* hanya dapat dihasilkan 24 tanaman hijau pada varietas Asemandi (Tabel 3). Sampai akhir penelitian ini, masih belum dapat diregenerasi-kan tanaman hijau dari varietas Rojolele dan Bengawan Solo, kecuali satu tanam-an albino dari Rojolele pada perlakuan *pRQ6/pUBB* (Tabel 1). Tampaknya varietas Rojolele memang merupakan varietas yang kurang tanggap terhadap kultur *in vitro*, seperti yang dikemukakan oleh Ambarwati (1993).

Perolehan tanaman hijau pada varietas yang sebelumnya kurang tanggap, seperti Asemandi pada penelitian tahun 1997/98 (0 tanaman), telah diperbaiki pada tahun (1998/99). Kalus yang mempunyai titik hijau (*green spots*) yang tidak dapat membentuk tanaman, dipindahkan ke dalam media NB yang diberi 2 mg/l kinetin dan 0,5 mg/l NAA (media  $NK_2N_{0,5}$ ). Setelah pemindahan kalus *green spots* pada media  $NK_2N_{0,5}$  pada perlakuan *pBar/pUBC* dapat diregenerasikan 24 tanaman hijau dari Asemandi (Tabel 3).

Hasil penelitian dengan menggunakan konstruksi plasmid yang berbeda dalam promotor yang digunakan menunjukkan bahwa transformasi dengan sistem ko-transformasi yang menggunakan dua macam konstruksi plasmid tidak berpe-ngaruh terhadap perolehan transforman (Tabel 1, 2, dan 3). Pada penelitian trans-formasi, baik yang menggunakan kombinasi *pRQ6/pUBB*, *pRQ6/pSBB*, maupun *pBar/pUBC* dapat menghasilkan transforman, sehingga tanggap varietas terhadap perlakuan *in vitro* dan penembakan oleh mikroprojektil tampaknya lebih merupa-kan tanggap yang bersifat genotipe *dependent*.

### Evaluasi Tanaman Putative Transgenik

Dari hasil kegiatan yang pertama diperoleh dua varietas yang dapat meng-hasilkan transforman, yaitu varietas Taipei-309 (118 tanaman) dan Asemandi (73 tanaman). Uji ekspresi gen Gus baru selesai dilakukan untuk transforman yang ber-asal dari sistem ko-transformasi yang menggunakan *pRQ6/pUBB*.

Diperoleh hasil uji Gus yang positif sebesar 66% (37 tanaman) dari 56 ta-naman  $T_0$  varietas Taipei-309 serta 25,6% (11 tanaman) dari 43 tanaman  $T_0$  varietas Asemandi (Tabel 4). Hasil uji Gus positif ditunjukkan dengan diperolehnya titik bi-ru (*blue spots*) pada eksplan yang diuji atau bahkan warna biru pada keseluruhan eksplan setelah diperlakukan dengan substrat *x-gluc* pada suhu 37°C selama 1 jam.

Hasil uji ekspresi gen Gus yang positif merupakan bukti bahwa transforman telah mengandung plasmid *pRQ6*. Hal ini juga didukung oleh adanya ketahanan terhadap antibiotika higromisin, karena konstruksi *pRQ6* tersebut mengandung gen *hph* yang mengkode ketahanan terhadap higromisin. Mengingat perbandingan molaritas antara *pRQ6* dengan *pUBB* adalah 1 : 4 dalam sistem ko-transformasi ini, maka tanaman putative transgenik yang mengandung gen *cry* diharapkan dapat diperoleh.

**Tabel 4.** Hasil uji Gus terhadap beberapa tanaman T<sub>0</sub> hasil transformasi dengan plasmid *pRQ6/pUBB*

Varietas	Jumlah transforman	Jumlah tanaman diuji	Hasil uji Gus		Persentase positif (%)
			Jumlah tanaman (+)	Jumlah tanaman (-)	
Taipei-309	91	56	37	19	66,0
Asemandi	49	43	11	32	25,6

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Dari varietas Taipei-309 diperoleh 91 tanaman putative transgenik awal (T<sub>0</sub>) asal ko-transformasi dengan *pRQ6/pUBB*, 24 tanaman T<sub>0</sub> asal ko-transformasi dengan *pRQ6/pSBB*.
2. Dari varietas Asemandi diperoleh 49 tanaman T<sub>0</sub> asal ko-transformasi dengan *pRQ6/pUBB* dan 24 tanaman T<sub>0</sub> asal ko-transformasi dengan *pBar/pUBC*.
3. Tidak semua tanaman T<sub>0</sub> yang diuji Gus dapat mengekspresikan Gus, pada tanaman dengan uji Gus positif diduga bahwa plasmid *pRQ6* telah terintegrasi dan gen Gus yang dibawanya telah dapat berekspresi dengan stabil pada T<sub>0</sub>.

### Saran

1. Masih perlu dilakukan modifikasi lain yang perlu diaplikasikan pada tahap regenerasi tanaman sesudah penembakan dengan mikroprojektil, sehingga dapat diperoleh jumlah tanaman yang representif. Jumlah tanaman yang lebih banyak akan membuka peluang lebih besar di dalam mendapatkan tanaman transgenik yang sesungguhnya, yaitu mengandung gen *cry* yang dapat diekspresikan dengan baik.
2. Walaupun terbukti bahwa plasmid *pRQ6* telah terintegrasi dan gen markah yang dibawanya, yaitu gen Gus dan *hph* dapat berekspresi, tetapi untuk mendapatkan tanaman transgenik yang mengandung gen *cry* masih diperlukan pengujian lebih lanjut baik secara molekuler maupun bioasai dengan hama penggerek batang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, A.D. 1993.** Regenerasi tanaman padi javanica, indica, dan japonica. *Dalam* Brotonegoro, S., T. Sudjana, A. Santika, dan A. Hardjamulia (*Eds.*). Prosiding Lokakarya Penelitian Komoditas dan Studi Khusus. AARP-Badan Litbang Pertanian Bekerja Sama dengan Dirjen DIKTI. hlm. 726-756.
- Birch, R.G. and T. Franks. 1991.** Development and optimization of microprojectile system for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:453-496.
- Birch, R.G. and R. Bower. 1994.** Principles of gene transfer using particle bombardment. *In* Sun-Yang, N. and P. Christou (*Eds.*). Particle Bombardment Technology for Gene Transfer. Oxford Press. New York, USA. p. 3-37.
- Fauquet, C.M., S. Zhang, L. Chen, P. Marmey, A. de Kochko, and R.N. Beachy. 1996.** Biolistic transformation of rice: Now efficient and routine for japonica and indica rices. *In* Khush, G.S. (*Ed.*). Proceeding of the 3<sup>rd</sup> International Rice Genetics Symposium, 16-20 October 1995. Manila, Philippines. p. 153-165.
- Fujimoto, H.K. Itoh, M. Yamamoto, J. Kyojuka, and K. Shimamoto. 1993.** Insect resistant rice generated by introduction of a modified endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11:1151-1155.
- Heinrich, E.A. 1980.** Varietal resistant to the brown planthopper and yellow stem-borer. *In* Rice Improvement in China and Other Asia Countries. IRRI and Chinese Acad. Agric. Sci. p. 195-218.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994.** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J.* 6(2):271-282.
- Hunold, R., R. Bronner, and G. Hahne. 1994.** Technical advance. Early Events in Microprojectile.
- Pathak, M.D. and Z.R. Khan. 1994.** Insect pests of rice. IRRI, Los Banos, Philippines.
- Soejitno, J., I. Hanarida, and B. Amirhusin. 1995.** Evaluation of several wild rice to rice stemborer (*Scirpophaga innotata* Wlk.). *Tidak dipublikasi.*
- Wunn, J., A. Kloti, P.K. Burkhardt, C.W.C. Biswas, K. Lauris, V.A. Iglesias, and I. Potrykus. 1996.** Transgenic indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cry* IA(b) gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/Technology* 14:171-176.