

Pengaruh Pemotongan Skutelum dan Jenis Bahan Pekat terhadap Pembentukan Kalus Embriogenik dan Regenerasi Tanaman dari Beberapa Varietas Padi

I.H. Slamet-Loedin¹, Maya Firdausi², Aay S. Rahayu¹, dan P.D. Tjondronegoro²

¹*Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Cibinong*

²*Jurusan Biologi FMIPA-IPB, Bogor*

ABSTRAK

Pembentukan kalus embriogenik dan regenerasi tanaman padi pada media biak jaringan antara lain tergantung pada jenis bahan pekat yang digunakan. Agarose Sigma tipe I umum digunakan untuk biak jaringan padi, tetapi secara ekonomis tidak menguntungkan. Pengaruh tiga jenis bahan pekat media induksi kalus padi (agarose Sigma tipe I, phytigel dan bacto agar) dengan dua konsentrasi yang berbeda diteliti pada biak padi yang berasal dari skutelum benih masak. Ternyata jumlah tanaman terbanyak diperoleh dari kalus yang diinduksi dengan phytigel pada konsentrasi 0,2%. Dibedakan juga tingkat regenerasi yang dihasilkan pada medium regenerasi yang dipadatkan dengan phytigel pada dua konsentrasi yang berbeda (0,2 dan 0,5%). Tingkat pematatan medium regenerasi dengan phytigel 0,5% memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan 0,2%. Pemotongan skutelum menjadi empat terbukti juga meningkatkan jumlah kalus embriogenik secara nyata.

Kata kunci: Padi, pemotongan skutelum, bahan pekat, kalus embriogenik, regenerasi.

ABSTRACT

Embryogenic callus formation and regeneration of rice on tissue culture media are depend on type of the solidifier agents used. Sigma agarose type I is common use for rice tissue culture, but it too expensive. effect of three kind of the solidifier agents (Sigma agarose type I, phytigel, and bacto agar) with two different concentrations were investigated on rice tissue culture using scutellum of mature seed. Result indicated that the highest number of plants were obtained from callus grown on culture media with phytigel 0.2%. But media with phytigel 0.5% give more plants rather than 0.2%. Scutellum desection into four fragments give the best result on embryogenic callus indication.

Key words: Rice, scutellum desection, solidifier agent, embryogenic callus, regeneration.

PENDAHULUAN

Introduksi gen asing pada tanaman padi sangat membutuhkan sistem regenerasi tanaman yang efisien dan dapat diulang kembali (*reproduksibel*). Salah satu bahan tanaman untuk introduksi gen melalui penembakan DNA maupun melalui

Agrobacterium tumefaciens ialah embriogenik kalus yang diinisiasi dari skutelum benih padi atau suspensi sel yang diinisiasi dari bahan yang sama (Hiei *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1993).

Beberapa sistem regenerasi kalus pada padi telah dilaporkan antara lain oleh Grimes dan Hodges (1990), Li dan Murai (1990), Rueb *et al.* (1994) umumnya menggunakan agarose sebagai bahan pematat. Jain *et al.* (1996) dalam laporannya juga merekomendasikan penggunaan 1% agarose untuk meningkatkan frekuensi regenerasi. Sedangkan pada teknik regenerasi tanaman dari kalus yang diperoleh dari protoplas umumnya digunakan 0,4 % (Abdullah *et al.*, 1986).

Agarose mempunyai tingkat kemurnian tinggi tetapi tidak ekonomis. Bahan pematat lain yang tersedia antara lain ialah phytigel dan bacto agar. Phytigel merupakan bahan sintesis yang 4-5 kali lebih murah dibandingkan agarose (katalog Sigma, 1996) serta konsentrasi yang diperlukan sebagai bahan pematat media lebih rendah. Pada penelitian ini diteliti perbedaan tingkat frekuensi regenerasi tanaman padi varietas Cisadane pada tiga jenis bahan pematat dengan dua konsentrasi yang berbeda.

Keterbatasan benih kadang dapat menjadi kendala. Pada percobaan diteliti pengaruh dari pembagian skutelum menjadi empat pada pembentukan kalus embriogenik.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan ialah benih padi varietas Cisadane, Rajalele, Koshihikari, dan IR64.

Sterilisasi Benih

Benih dilepaskan dari skutelum, disterilisasi permukaan dengan pencucian alkohol 70% selama satu menit, dibilas dengan akuades steril, direndam dengan Bayclin 60% selama 30 menit, kemudian dibilas kembali lima kali dengan akuades steril. Benih ditiriskan di atas kertas saring dan siap ditanam di media IK3.

Penanaman

Benih ditanam pada media Linsmaer dan Skoog (1965) dengan tambahan 2,5 mg/l 2,4-D. Media dipadatkan dengan bacto agar, atau agarose atau phytigel. Khusus untuk agarose, agar diperoleh pematatan yang baik maka diperlukan pembuatan media cair dua kali konsentrasi dan media padat dua kali konsentrasi, diautoklaf masing-masing, baru kemudian dicampur saat akan dituang ke cawan Petri

(diameter 10 cm). Bagian dasar cawan sebelum digunakan dibagi menjadi 10 kotak untuk mengidentifikasi skutelum. Media regenerasi yang digunakan adalah media dasar Linsmaer dan Skoog dengan tambahan 0,3 mg/l BAP dan 0,5 mg/l IAA. Stook IAA dipisahkan pada eppendorf 1,5 ml dan disimpan pada -20°C, untuk mencegah degradasi dan ditambahkan setelah media diautoklaf. Media regenerasi dipadatkan dengan phytagel 0,2 % atau 0,5%. Planlet yang tumbuh kemudian dipindahkan pada media MS tanpa hormon. Pada percobaan pemotongan skutelum maka skutelum diisolasi dari endosperm satu minggu setelah tanam kemudian diiris menjadi empat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Pemotongan Skutelum terhadap Pembentukan Kalus Embriogenik

Tabel 1 menunjukkan persentase skutelum yang membentuk kalus. Pembentukan kalus lebih banyak pada skutelum yang tidak dibagi. Dari keempat varietas secara umum ternyata kalus terbanyak ialah kalus dari varietas Cisadane.

Tabel 2 menunjukkan rata-rata dari total diameter kalus yang dibentuk oleh satu skutelum. Skutelum yang dibagi membentuk kalus hampir tiga kali lebih banyak dibandingkan dengan skutelum yang tidak dibagi.

Tabel 3 menunjukkan persentase kalus yang embriogenik dari total kalus yang ada. Kalus embriogenik adalah kalus yang globular, kering, dan translusens (Slamet, 1991). Skutelum utuh ternyata memberikan persentase kalus yang sedikit lebih tinggi.

Tabel 1. Persentase skutelum/perempat skutelum yang membentuk kalus.

Perlakuan	Rata-rata
Skutelum dibagi	58,2 ^b
Skutelum utuh	83,4 ^a
IR64	66,7 ^b
Koshihikari	74,0 ^{ab}
Rajalele	51,3 ^b
Cisadane	91,4 ^a
IR64 dibagi	58,2 ^a
IR64 tidak dibagi	75,2 ^a
Koshihikari dibagi	56,0 ^a
Koshihikari tidak dibagi	91,9 ^a
Rajalele KA dibagi	29,2 ^a
Rajalele KA tidak dibagi	73,3 ^a
Cisadane dibagi	89,4 ^a
Cisadane tidak dibagi	93,3 ^a

Keterangan: Huruf yang berbeda menyatakan perbedaan nyata pada selang kepercayaan 95%. Ulangan 3 cawan petri, 10 benih/cawan petri.

Tabel 2. Diameter kalus/skutelum pada beberapa varietas padi.

Perlakuan	Rata-rata (cm) [*]
Skutelum dibagi	1,13 ^a
Skutelum utuh	0,36 ^b
IR64	0,77 ^b
Koshihikari	0,74 ^b
Rajalele KA	0,32 ^c
Cisadane	1,16 ^a
IR64 dibagi	1,27 ^{ab}
IR64 tidak dibagi	2,76 ^d
Koshihikari dibagi	10,53 ^{bc}
Koshihikari tidak dibagi	4,30 ^d
Rajalele KA dibagi	3,93 ^d
Rajalele KA tidak dibagi	2,46 ^d
Cisadane dibagi	18,2 ^a
Cisadane tidak dibagi	5,1 ^{cd}

Keterangan: Huruf yang berbeda menyatakan perbedaan nyata pada selang kepercayaan 95%.

^{*}Rata-rata diameter dihitung dari diameter kalus yang terbentuk dibagi jumlah benih yang ditanam

Tabel 3. Persentase kalus embriogenik pada beberapa varietas padi.

Perlakuan	Rata-rata
Skutelum dibagi	29,7 ^b
Skutelum utuh	39,1 ^a
IR64	40,7
Koshihikari	37,9
Rajalele KA	30,8
Cisadane	28,3
IR64 dibagi	109,5
IR64 tidak dibagi	135,0
Koshihikari dibagi	87,0
Koshihikari tidak dibagi	140,5
Rajalele KA dibagi	82,0
Rajalele KA tidak dibagi	103,0
Cisadane dibagi	79,0
Cisadane tidak dibagi	91,0

Keterangan: Huruf yang berbeda menyatakan perbedaan nyata pada selang kepercayaan 95%.

Tabel 4. Rata-rata diameter dari kalus yang embriogenik (perkalian % kalus embriogenik dengan diameter kalus).

Perlakuan	Rata-rata
Skutelum dibagi	0,33 ^a
Skutelum utuh	0,14 ^b
IR64	0,29 ^a
Koshihikari	0,25 ^a
Rajalele KA	0,10 ^b
Cisadane	0,30 ^a
IR64 dibagi	0,45 ^a
IR64 tidak dibagi	0,13 ^{bc}
Koshihikari dibagi	0,30 ^{ab}
Koshihikari tidak dibagi	0,20 ^{bc}
Rajalele KA dibagi	0,11 ^c
Rajalele KA tidak dibagi	0,09 ^c
Cisadane dibagi	0,47 ^a
Cisadane tidak dibagi	0,14 ^{bc}

Keterangan: Huruf yang berbeda menyatakan perbedaan nyata pada selang kepercayaan 95%.

Tabel 4 menunjukkan perkalian kalus embriogenik dengan diameter kalus untuk melihat perbedaan peningkatan jumlah total kalus yang embriogenik antara pemotongan skutelum dan tanpa pemotongan. Jumlah total kalus embriogenik ternyata 2,3 kali lebih banyak pada pemotongan skutelum menjadi empat.

Pengaruh Bahan Pematik pada Media Induksi Kalus

Hasil percobaan pengaruh bahan pematik disajikan pada Tabel 5. Tabel ini menunjukkan persentase benih yang menghasilkan kalus pada media Linsmaer dan Skoog dengan tambahan 2,5 mg/l 2,4-D yang dipadatkan dengan bahan pematik medium yang berbeda. Kemudian kalus yang terbentuk dari 20 skutelum benih dipindahkan ke media regenerasi yang sama (Linsmaer dan Skoog dengan tambahan 0,3 mg/L BAP dan 0,5 mg/l IAA dengan pemadatan 0,2% phytigel). Ternyata persentase kalus yang beregenerasi dari kalus yang hidup lebih tinggi pada pematik media asal phytigel 0,2%, demikian juga jumlah tanaman per kalus.

Tabel 5. Pengaruh bahan pematat pada media induksi kalus.

Rata-rata persentase benih yang menghasilkan kalus*			% kalus yang regenerasi	rata-rata jumlah tanaman/kalus
Agarose	0,4 %	76,6 ± 7,5	16,7	3,0
Agarose	1,0 %	64,3 ± 15,0	16,7	4,5
Agar	0,8 %	51,4 ± 8,3	-	-
Agar	2,0 %	62,8 ± 15,8	-	-
Phytigel	0,2 %	67,1 ± 11,6	33,3	12,0
Phytigel	0,5%	56,0 ± 18,5	66,7	11,0

Keterangan: *Ulangan 7 petri masing-masing 10 benih.

Tabel 6. Pengaruh bahan pematat pada media regenerasi pada tingkat regenerasi.

Media regenerasi dengan 0,2% phytigel		Media regenerasi dengan 0,5% phytigel	
% kalus yang beregenerasi	Jumlah tanaman/ kalus	% kalus yang beregenerasi	Jumlah tanaman/kalus
40,0	10,5	76,7	8,0

Keterangan: Ulangan tiga petri masing-masing 10 benih.

Perbedaan Dua Konsentrasi Bahan Pematat pada Media Regenerasi pada Frekuensi Regenerasi

Tingkat kepadatan media regenerasi menurut Jain *et al.* (1996) mempengaruhi frekuensi regenerasi dengan meningkatnya cekaman air. Pada Tabel 6 terlihat bahwa phytigel 0,5% memberikan regenerasi yang lebih baik dibandingkan dengan phytigel 0,2%. Pada percobaan ini seluruh kalus diinisiasi pada media inisiasi kalus dengan bahan pematat 0,2% phytigel, baru kemudian diregenerasikan pada media regenerasi dengan tingkat kepadatan berbeda. Peningkatan regenerasi yang terjadi pada penggunaan phytigel 0,5% di media regenerasi kemungkinan disebabkan oleh kurangnya kondensasi dan pertukaran oksigen yang lebih baik.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pembagian skutelum menjadi empat meningkatkan pembentukan kalus embriogenik secara nyata.

Bahan pematat media induksi kalus phytigel 0,2% memberikan frekuensi regenerasi yang lebih tinggi dari agarose maupun bacto agar.

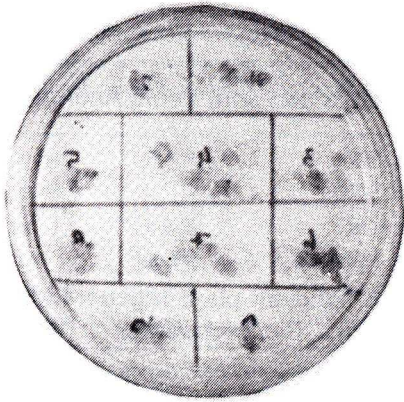
Bahan pematat media regenerasi phytigel 0,5% memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan phytigel 0,2%.

UCAPAN TERIMA KASIH

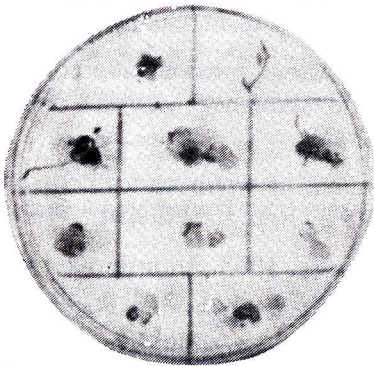
Penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan teknis dari sdri. Yenni Andriani dan pemotretan oleh sdr. Yitno Riadi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah R., E.C. Cocking, and J.A. Thompson. 1986.** Efficient plant regeneration from rice protoplasts through somatic embryogenesis. *Bio/Technology* 4:1087-1093.
- Grimes H.D and T.K. Hodges. 1990.** The inorganic $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ ratio influences plant regeneration and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 136: 362-367.
- 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 Journal* 6 (271-282).
- Jain, R.K., S. Jain, and R. Wu. 1996.** Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic indica rice varieties. *Plant Cell Rep.* 15: 449-454.
- Li, L., R. Qu, A. de Kochko, C. Fauquet, and R.N. Beachy. 1993.** An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* 12: 250-255.
- Li, Z. and N. Murai. 1990.** Efficient plant regeneration from rice protoplasts in general medium. *Plant Cell Rep.* 9: 216-220.
- Linsmaer, E.M. and F. Skoog. 1965.** Organic growth requirement of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18: 100-127
- Poonsapaya, P., M.W. Nabors, K. Wright, and M. Vajrabhaya. 1989.** A comparison of method for callus culture and plant regeneration of RD 25 rice (*Oryza sativa* L.) in two laboratories. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16: 175-186.
- Rueb S., R.A. Leneman, Schilperoort, and L.A.M. Hensgens. 1994.** Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.).
- Slamet, I.H. 1991.** Protoplast culture and somatic hybridization of indica and japonica rice cultivars. PhD. Thesis.



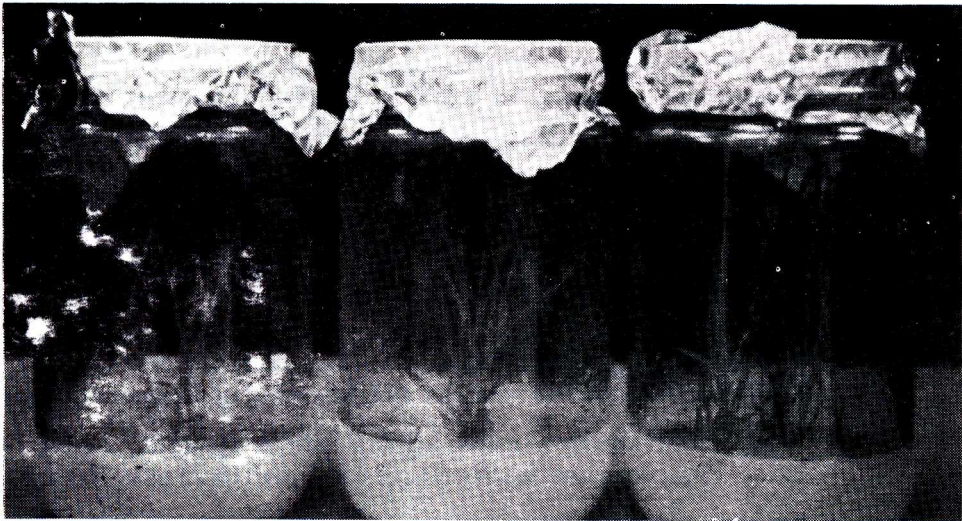
Gambar 1. Kalus pada media inisiasi.



Gambar 2. Kalus pada media regenerasi.



Gambar 3. Pembentukan tunas.



Gambar 4. Planlet hasil regenerasi.