

**PENELITIAN PEMULIAAN TANAMAN (T.U. 01.6307)  
PERBAIKAN MUTU VARIETAS PADI MELALUI REKAYASA GENETIKA**

Inez H.S., Made S.P., M. Ahkam S., Sri Hartati, S. Hutajulu, W. Rahayu,  
A.S.Rahayu. Oceng, Yenny A., B. Mussadarini, Suprijatna, E. Suhendar, Lasimur,  
M. Sajam, T. Sumardiman, A. Purnawan

**ABSTRAK**

Sistem perbanyakkan kalus embriogenik padi (globular, translusens, tidak basah) telah diperoleh untuk tanaman padi varietas IR 64, Cisadane (indica) dan Rajelele (javanica). Media yang digunakan adalah media induksi kalus Linsmaier dan Skoog dengan penambahan 2.5mg/l 2.4-D dan dipadatkan dengan 0,2% phytigel, dilanjutkan dengan media regenerasi Linsmaier dan Skoog dengan penambahan hormon 0,3 mg/l BAP dan 0.5 mg/l IAA dipadatkan dengan 0,5% phytigel. Pengirisan skutelum menjadi 4 pada umur 7 hari setelah germinasi meningkatkan jumlah total kalus embriogenik secara nyata. Optimisasi penembakan DNA menunjukkan bahwa jumlah kalus padi yang memberikan ekspresi gen *gus-A* pada penembakan DNA dengan menggunakan plasmid yang berisikan gen *gus-A* yang dikendalikan oleh promoter ubiquitin dari jagung (plasmid pAHC25) dibandingkan dengan gen *gus-A* yang dikendalikan promoter 35 S dari virus kauli mosaik (plasmid pPC100) tidak menunjukkan perbedaan. Untuk jenis penembakan DNA yang digunakan peletakan target penembakan pada level 1 lebih baik dibandingkan level 2. Penembakan dengan pAHC 25 menghasilkan planlet IR 64 yang tahan terhadap herbisida bialaphos. Perbanyakkan vektor DNA yang mengandung gen chitinase telah dilakukan.

Kata Kunci : Padi jenis indica, javanica, penembakan DNA, gen ketahanan terhadap kapang, *chitinase*, busuk pelepah daun, blas, *Galanthus nivalis agglutinin (gna)*, *cry I A(b)*.

**PENDAHULUAN**

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari tahun 1995/1996 Pada periode tersebut telah diperoleh planlet yang mengekspresikan gen asing pada padi lahan kering kultivar Maninjau, tetapi frekuensi transformasi masih sangat rendah. Tujuan jangka pendek dari penelitian ini ialah untuk memperoleh materi genetik (vektor DNA) mengandung gen chitinase, penyandi ketahanan terhadap kapang dan mendapatkan teknologi transformasi genetik padi-padi Indonesia atau jenis padi unggul yang banyak ditanam di Indonesia. Sasaran jangka panjang pada awal mula penelitian ini ialah memperoleh tanaman padi tahan terhadap penyakit kapang pada

umumnya dan penyakit kapang blas pada khususnya dengan menggunakan gen chitinase penyandi ketahanan terhadap kapang. Muthukhrisnan *et al.* (1995) dalam laporannya memperlihatkan bahwa chitinase efektif untuk penyakit busuk pelepah daun yang disebabkan oleh kapang *Rhizoctonia solani*, namun keefektifannya untuk penyakit blas yang disebabkan oleh *Magnaporthe grisea* belum diketahui. Disamping itu ketahanan terhadap blas saat ini telah dideteksi terdapat pada beberapa galur padi hasil pemuliaan. Penyakit busuk pelepah daun juga banyak menurunkan produksi tanaman padi terutama pada padi sawah. Sumber gen ketahanan terhadap penyakit ini tidak terdapat secara alami pada padi budidaya maupun padi liar, sehingga pendekatan rekayasa genetika sangat diperlukan mengatasi penyakit busuk pelepah daun. Pada penelitian ini dilakukan optimisasi beberapa parameter kultur jaringan padi untuk meningkatkan regenerasi tanaman, optimisasi penembakan dengan menggunakan gen ketahanan terhadap antibiotik maupun herbisida dan persiapan materi genetik plasmid DNA yang mengandung gen chitinase. Selama menunggu persiapan materi genetik gen chitinase dilakukan pula penembakan secara ko-transformasi dengan 3 plasmid yang telah ada yaitu plasmid yang mengandung gen ketahanan terhadap wereng (gen *gna*), penggerek batang (gen *cry I A b*) dan gen penyeleksi ketahanan terhadap antibiotik. Planlet yang hidup pada media mengandung antibiotik berhasil diperoleh dari percobaan ko-transformasi ini.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan

#### 1. Benih Padi

Benih padi yang digunakan adalah dari varietas IR 72, IR64, Rajalele dari Karang Agung dan Cisadane.

#### 2. Plasmid

Plasmid yang digunakan adalah pCambia 1200, pAHC25 dan pPC100, pChi II, pUbi-*gna* dan pUbi *cry I A (b)*. Peta plasmid dapat dilihat di lampiran.

### 3. Media

Media yang digunakan adalah media induksi kalus padat Linsmaier dan Skoog (1965) dengan penambahan 2,5mg/l 2,4-D dan media regenerasi padat Linsmaier dan Skoog dengan penambahan hormon 0,3 mg/l BAP dan 0,5 mg/l IAA (Rueb *et al.*, 1994), dilanjutkan dengan media Murashige dan Skoog tanpa hormon.

## Cara Kerja

### 1. Sterilisasi

Sterilisasi media dilakukan dengan autoklaf pada tekanan 121°C selama 15 menit. Sterilisasi antibiotik, hormon dan asam amino dilakukan dengan cara filtrasi menggunakan membran ukuran 0,2 µm. Benih padi disterilisasi permukaan dengan menggunakan 70 % etoh selama 10 menit diikuti oleh HgCl<sub>2</sub> 0,05 % selama 20 menit atau 100 % Bayclin selama 10 menit, dikuti dengan 5 kali pencucian dengan aquadest steril.

### 2. Persiapan materi penembakan

#### -Kultur kalus

Benih padi di-oven selama 3 hari pada suhu 50<sup>o</sup> C untuk memecah dormansinya. Benih padi IR 64, Cisadane, Koshihikari, Rajalele KA disterilisasi permukaan, kemudian ditanam pada media induksi kalus dengan tambahan cefotaxime 50 mg/l, carbenicillin 200 mg/l dan benlate 10 mg/l. Tujuh hari setelah tanam, embrio dari benih dipisahkan dari endosperm. Diteliti perbedaan antara kultur embrio yang utuh dan skutelum diiris menjadi 4, ditanam kembali pada media yang sama. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan masing-masing 10 benih. Diteliti pula pengaruh media yang berbeda dan bahan pematat yang berbeda. Kalus di sub-kultur setiap 3 minggu. Pada setiap Petri ditanam 10 skutelum. Satu petri merupakan satu ulangan dan digunakan 3-7 ulangan. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap.

**-Penanaman di rumah kaca**

Benih padi IR 64, Cisadane, Koshihikari, Rajalele KA disemai di rumah kaca selama 21 hari kemudian ditransplantasi ke pot. Tanaman padi ditumbuhkan sampai fase masak susu kemudian embrio belum masak diisolasi dari malai padi.

**3. Persiapan materi genetik**

**-Perbanyak dan isolasi plasmid**

Plasmid yang diperbanyak dan diisolasi adalah pAHC25, pPC100 dan pCHI II. Isolasi plasmid mencakup persiapan kompeten sel, perbanyak kultur bakteri, isolasi plasmid dan analisis restriksi. Kompeten sel dipersiapkan sesuai dengan Promega Manual (1995) dari bakteri DH 5  $\alpha$ . Isolasi plasmid dilakukan sesuai dengan manual dari Qiagen Plasmid kit. Analisis restriksi, analisa pada gel elektroporesis dilakukan sesuai dengan metode Sambrook *et al.* (1989).

Plasmid pAHC25 diperoleh dari Dr. P. Quail (Plant Gene Expression Center-USA) mengandung gen penyeleksi *bar* penyandi ketahanan terhadap herbisida bialaphos dan gen penanda *gus-A* penyandi enzim  $\beta$ -glucuronidase. Kedua gen dikontrol oleh promoter ubiquitin dari jagung.

Plasmid pPC100 diperoleh dari Dr. P. Qhristou (John Innes Center-UK) mengandung gen penyeleksi *hptII* penyandi ketahanan terhadap antibiotik higromisin dan gen penanda *gus-A*, kedua gen dikontrol oleh promoter 35 S dari kauli mosaik virus.

Plasmid pChi II mengandung gen chitinase dari barley sebesar 1,1 kilobasa, dengan skema sebagai berikut.:

<b>CaMV35S</b> 0.4 kb	<b>Chi</b> 1.1 kb	<b>NOS</b>
--------------------------	----------------------	------------

Promoter

gen chitinase

terminator

Plasmid pUbi-GNA dan plasmid pUbi *cry* I A(b) diperoleh dari Dr. P. Christou (John Innes Centre-UK). Seluruh peta plasmid yang digunakan dapat dilihat pada lampiran.

#### - Konstruksi vektor

Plasmid yang dipilih sebagai sumber gen higromisin adalah pCambia 1200. Plasmid ini diperoleh dari Dr. R. Jefferson (CAMBIA-Australia). Plasmid ditransformasi ke bakteri *E. coli* DH 5  $\alpha$ , diperbanyak, diisolasi dan dilarutkan pada buffer TE. Gen higromisin dengan promoter dan terminatornya dari plasmid ini dipotong dengan enzim Bgl-II, dijalankan di gel elektroforesis dan fragmen yang mengandung gen higromisin diisolasi. Sedianya akan diligasi dengan pChi II, tetapi oleh karena keterlambatan memperoleh materi gen chitinase maka percobaan ini akan dilanjutkan pada periode tahun berikutnya. Alternatif yang dilakukan adalah ko-transformasi antara pChi II dengan pAHC25.

#### 4. Penembakan DNA

Penembakan DNA dilakukan dengan menggunakan plasmid pAHC25, pPC100, pUbi-*gna*, pUbi-*cry* I A(b) dan pCHI II. Penembakan dilakukan dengan satu plasmid dan lebih dari satu plasmid (ko-transformasi). Penembakan dilakukan dengan menggunakan particle inflow gun dan electric discharge particle acceleration. Penembakan dengan particle inflow gun dilakukan dengan tekanan 2500 kPa sedangkan untuk electric gun digunakan 18 Kv. Penembakan dengan particle discharge acceleration sesuai dengan protocol Christou *et al.* (1991).

Prosedur coating DNA untuk particle inflow gun dengan menggunakan tubing dilakukan dengan cara sebagai berikut : 5 mg emas diletakkan ke eppendorf, ditambahkan 10 ug DNA yang dilarutkan pada 100 ul buffer XHO , distabilkan dengan 100 ul larutan 0,1 M spermidine dan 100 ul larutan 25 % PEG (1500), dipresipitasi dengan 100 ul larutan 2,5 M CaCl<sub>2</sub>. Pellet DNA diresuspensikan pada 100 % ethanol, disonikasi, dialirkan pada tubing kemudian dikeringkan. Untuk ko-transformasi 2 plasmid, plasmid dilarutkan dengan perbandingan gen ketahanan dan

gen seleksi sebagai berikut 3:1 (w/w). Untuk 3 plasmid dilakukan perbandingan gen ketahanan 1:gen ketahanan 2: gen penyeleksi sbb: 3:3:1 (w/w).

Target penembakan antara lain ialah kalus dari skutelum benih padi yang diisolasi 4, 5, 7 dan 14 hari setelah tanam serta embrio belum masak. Perlakuan osmotikum 0,4 M manitol dilakukan 2x 4 jam pada kalus berumur 14 hari. Uji gus dilakukan sesuai dengan protokol menurut Jefferson *et al.* (1987) dengan beberapa modifikasi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### I. Persiapan materi penembakan

Kultur kalus.

#### 1. Pengaruh pemotongan embrio pada pembentukan kalus embriogenik.

Dari kegiatan kultur kalus diperoleh kalus embriogenik padi. Tabel 1 menunjukkan hasil analisis statistik Uji Beda Nyata Jujur Tukey dari kualitas dan kuantitas kalus antara 4 varietas dan antara kultur embrio padi utuh dan dibagi 4. Kualitas kalus tergambar dari jumlah kalus embriogenik yang diperkirakan mampu beregenerasi, sedangkan kuantitas kalus digambarkan dengan parameter diameter kalus.

Tabel 1. Pengaruh pemotongan embrio pada pembentukan kalus embriogenik

Perlakuan	Diameter kalus/skutelum Rata-rata (cm)	% kalus embriogenik Rata-rata (%)	Jumlah kalus embriogenik* Rata-rata
Embrio dibagi	1,13 a	29,7 b	0,33 a
Embrio utuh	0,36 b	39,1 a	0,14 b
IR 64	0,77 b	40,7	0,29 a
Koshihikari	0,74 b	37,9	0,25 a
Rajalele KA	0,32 c	30,8	0,10 b
Cisadane	1,16 a	28,3	0,30 a
IR 64 dibagi	1,27 ab	109,5	0,45 a
IR 64 tidak dibagi	2,76 d	135,0	0,13 bc
Koshihikari dibagi	10,53 bc	87,0	0,30 ab
Koshihikari tidak dibagi	4,30 d	140,5	0,20 bc
Rajalele KA dibagi	3,93 d	82,0	0,11 c
Rajalele KA tidak dibagi	2,46 d	103,0	0,09 c
Cisadane dibagi	18,2 a	79,0	0,47 a
Cisadane tidak dibagi	5,1 cd	91,0	0,14 bc

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

\*Rata-rata diameter dari kalus yang embriogenik (perkalian % kalus embriogenik dengan diameter kalus). Ulangan 3 Petri, masing-masing 10 benih.

Dari Tabel 1. di atas terlihat bahwa diameter kalus dari keempat potongan embrio lebih besar pada kalus yang dibagi. Meskipun persentase kalus embriogenik lebih besar pada kalus yang tumbuh dari skutelum dari embrio utuh, tetapi jumlah total kalus yang embriogenik 2,67 kali lebih besar pada embrio terbagi 4. Perbedaan nyata terlihat pada varietas IR 64 dan Cisadane. Perbanyakan ini sangat berguna untuk benih-benih yang jumlahnya terbatas dan untuk menghemat media dan cawan Petri.

## 2. Pengaruh bahan pematat media induksi kalus pada tingkat regenerasi tanaman.

Tiga bahan pematat media yang berbeda dicobakan sebagai bahan pematat media induksi kalus. Hasil percobaan pengaruh bahan pematat dapat dilihat pada Tabel 2. Tabel ini menunjukkan persentase benih yang menghasilkan kalus pada media Linsmaer dan Skoog mengandung 2,5 mg/l 2,4-D yang dipadatkan dengan bahan pematat medium yang berbeda. Kalus yang terbentuk dari 20 skutelum benih dipindahkan ke media regenerasi yang sama (Linsmaier 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 dan jumlah tanaman per kalus yang hidup lebih tinggi pada pematat media asal phytigel 0,2 %.

Tabel 2. 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 %	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	66,7	12,0
Phytigel 0,5 %	56,0 ± 18,5	33,3	11,0

\*Ulangan 7 petri masing-masing 10 benih.

## 3. Perbedaan 2 konsentrasi bahan pematat pada media regenerasi pada frekuensi regenerasi

Tingkat kepadatan media regenerasi menurut Jain dkk. (1996) mempengaruhi frekuensi regenerasi dengan meningkatnya cekaman air. Pada Tabel 3. terlihat bahwa phytigel 0,5 % memberikan regenerasi yang lebih baik dibandingkan dengan 0,2 %. Pada percobaan ini seluruh kalus diinisiasi pada media inisiasi kalus dengan bahan



pemadat 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 berkurangnya kondensasi dan adanya pertukaran oksigen yang lebih baik.

Tabel 3. Pengaruh bahan pematik pada media regenerasi pada tingkat regenerasi.

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

Ulangan 3 Petri masing-masing 10 benih.

\*dihitung dari jumlah tanaman yang dihasilkan oleh kalus yang beregenerasi.

## II. Persiapan materi genetik

### -Isolasi plasmid

Telah dibuat kompeten sel *E.coli* XL-1 blue DH 5  $\alpha$ . Kompeten sel digunakan untuk transformasi dari pAHC25, pPC100 dan pCambia 1200. Ketiga plasmid berhasil diperbanyak dan diisolasi. Jumlah plasmid yang diperoleh dari isolasi pAHC25 ialah 300 ul dengan konsentrasi 1,2 mg/ml, tingkat kemurnian 93 %. Plasmid yang diperoleh dari 3 hasil isolasi pPC100 adalah sebanyak masing-masing 100 ul dengan konsentrasi 2,4 mg/ml; 0,72 mg/ml dan 0,945 mg/ml. Tingkat kemurnian berurutan 94 %, 95 % dan 83 %. Kemudian dilakukan analisis restriksi pada pPC100 dengan menggunakan enzim *Hind* III. Analisis restriksi pada pAHC25 dilakukan dengan pemotongan menggunakan enzim *Eco*RI dan *Bam*H I.

### -Konstruksi vektor

Plasmid pCambia 1200 telah diperbanyak. Fragmen *hyg* telah diisolasi dari plasmid pCambia 1200. Vektor yang direncanakan akan mengandung gen *hyg* di

bawah kontrol promoter 35 S, gus-A di bawah kontrol promoter ubiquitin dan gen chitinase I di bawah kontrol promoter 35 S. Terdapat permasalahan bahwa plasmid yang mengandung gen chitinase diperoleh sangat lambat. Plasmid ditransformasikan ke dalam sel bakteri kompeten dan ditanam pada media LB mengandung ampicillin, kemudian koloni yang tumbuh diperbanyak. Plasmid berhasil diisolasi dan dilarutkan pada 100 ul TE buffer dengan konsentrasi 1,7 ug/ul. Tahap selanjutnya akan dilakukan pada tahun berikut. Sementara pendekatan yang dilakukan adalah ko-transformasi (2 plasmid ditembakkan pada saat yang bersamaan) dengan menggunakan plasmid pAHC25 dengan pChi II.

### III. Penembakan DNA

Sebelum gen chitinase diperoleh dilakukan optimisasi penembakan DNA dan dilakukan pula penembakan DNA menggunakan plasmid yang lain dengan gen ketahanan terhadap herbisida pAHC 25 dan ko-transformasi gen ketahanan pada penggerek batang dan gen ketahanan pada wereng coklat. Ko-transformasi juga dilakukan antara pAHC 25 dan pChi II.

#### *-Optimisasi penembakan*

Optimisasi penembakan perlu dilakukan untuk alat penembak yang baru diperoleh. Parameter yang dilihat adalah level target penembakan, umur skutelum dan plasmid.

Pada pengujian level target penembakan digunakan bahan kalus, sedangkan percobaan setelah itu menggunakan skutelum yang diisolasi dari benih umur 4-5 hari atau dasar hipokotil (1-2 mm). Hasil optimisasi penembakan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Kalus yang berekspresi *gus* pada level dan jumlah penembakan berbeda.

Level	$\Sigma$ Penembakan	% <i>gus</i> <sup>+</sup> kalus
1	1x	5
1	2x	0
2	1x	0
2	2x	1,6

Varietas : Koshihikari

Plasmid : pAHC

Tekanan : 250 kPa

$\Sigma$  skutelum : 20 skutelum/target

Jumlah ulangan: 3x

Tabel 5. Penembakan skutelum berumur 4 hari.

Varietas	Plasmid	% <i>gus</i> <sup>+</sup> kalus
Cisadane	pPC100	60
IR64	pPC100	80
Koshihikari	pPC100	80
IR64	pAHC25	80
Cisadane	pAHC25	100
Koshihikari	pAHC25	<u>60</u>
		X = 76,7

Varietas : IR64, Koshihikari, Cisadane, umur 4 hari

Plasmid : pAHC25, pPC100

Tekanan : 2500 kPa

Penembakan : 2x

$\Sigma$  skutelum yang diuji *gus*: 5

Tabel 6. Penembakan skutelum berumur 5 hari

Varietas	Plasmid	% <i>gus</i> <sup>+</sup> kalus
IR64	pPC100	80
Cisadane	pPC100	100
Koshihikari	pPC100	100
IR64	pAHC25	60
Cisadane	pAHC25	60
Koshihikari	pAHC25	60
		X = 76,7

Varietas : IR64, Koshihikari, Cisadane, umur 5 hari

Plasmid : pAHC25, pPC100 Tekanan : 2500 kPa

Level : 1 (di bawah)

Σ skutelum yang diuji *gus*: 5

Tabel 7. Penembakan DNA pada beberapa varietas padi dengan plasmid pAHC25 dan pPC100.

Varietas	pAHC25				pPC100			
	Skutelum <i>gus</i> <sup>+</sup>	%	Hipokotil	%	Skutelum <i>gus</i> <sup>+</sup>	%	Hipokotil	%
Maninjau	1	20	-	-	2	40	2	40
Koshihikari	1	20	1	20	1	20	0	0
IR64	2	40	-	-	3	60	-	-
Rajalele	2	40	2	40	2	40	1	20
X		30		15		40		15

Varietas : Koshihikari, IR64, Maninjau, Rajalele umur 6 hari

Plasmid : pAHC25, pPC100

Tekanan : 2500 kPa

Σ skutelum yang di uji *gus*: 5

Tabel 8. Penembakan DNA pada skutelum beberapa varietas padi dengan plasmid pAHC25 dan pPC100.

Varietas	Plasmid	Jumlah skutelum <i>gus</i> <sup>+</sup>	%
Maninjau	pPC100	5	100
IR64	pPC100	4	80
Koshihikari	pPC100	3	60
Maninjau	pAHC25	4	80
IR64*	pAHC25	5	100
Koshihikari	pAHC25	4	80

Varietas : IR64, Maninjau, Koshihikari

Plasmid : pAHC25, pPC100

Σ skutelum yang di-*gus*: 5 per target (1 target 20 skutelum)

Tekanan : 2500 kPa

Dari Tabel 4. terlihat bahwa level 1 lebih baik dibandingkan dengan level 2. Dari Tabel 5. dan Tabel 6. terlihat bahwa ternyata umur skutelum tidak terlalu menentukan. Tetapi sebenarnya jumlah titik biru per kalus (tidak dicantumkan) lebih tinggi pada skutelum umur 5 hari dan pada penembakan dengan plasmid pAHC25 (*gus-A* dikontrol oleh promoter ubiquitin dari jagung). Dari Tabel 7 dan 8 dapat dilihat bahwa jika dilihat dari jumlah skutelum dan hipokotil bereksresi *gus* maka tidak terlihat perbedaan yang nyata antara kedua plasmid. Hasil dari penembakan ini diperolehnya 2 kalus IR 64 yang tahan terhadap bialaphos dan dari kalus tersebut diperoleh 20 planlet di media regenerasi, 15 diantaranya telah dipindah ke media pemeliharaan.

## 2. Penembakan dengan menggunakan pUBI-GNA, pUBI-Bt.

Penelitian ini dilakukan untuk mencoba ko-transformasi sambil menunggu persiapan vektor yang mengandung gen chitinase. Ko-transformasi dilakukan dengan menggunakan gen ketahanan terhadap wereng coklat *gna* (*galanthus nivalis agglutinin*) dan gen ketahanan terhadap penggerek batang, *cry I A(b)*.

Tabel 9. Ko-transformasi kalus dari skutelum padi kultivar Rajalele dengan plasmid mengandung gen *gna* dan pUbi *cry I A(b)*.

No. Petri	Jumlah skutelum	Jumlah skutelum yang hidup	Jml. Pot Skutelum	Jml. Pot Skutelum yg hidup	Rata-rata Presentase yg Tumbuh	Plantlet
1.	8	7	64	28	43,750	3
2.	11	10	63	33	52,381	-
3.	7	7	22	11	50,000	-
4.	7	6	38	17	44,737	-
5.	9	8	66	25	37,879	14
6.	9	8	87	45	51,724	4
7.	8	6	51	23	45,098	11
8.	7	2	25	3	12,000	-
9.	6	3	41	11	26,829	-
10.	5	1	17	1	5,882	44

Plantlet diperoleh dari kalus-kalus yang resisten terhadap higromisin dari kultivar Rajalele yang telah ditembak dengan gen *gna* dan gen *cry I A(b)* dan gen penyeleksi *hyg* (Tabel 9).

## 3. Penembakan dengan chi II.

Penembakan dengan plasmid mengandung gen Chi II dilakukan secara ko-transformasi dengan plasmid pAHC 25. Materi yang digunakan adalah embrio belum

masak dari kultivar Cisadane umur 1 hari setelah isolasi dan 14 hari. Ternyata terjadi kontaminasi pada embrio belum masak.

## KESIMPULAN

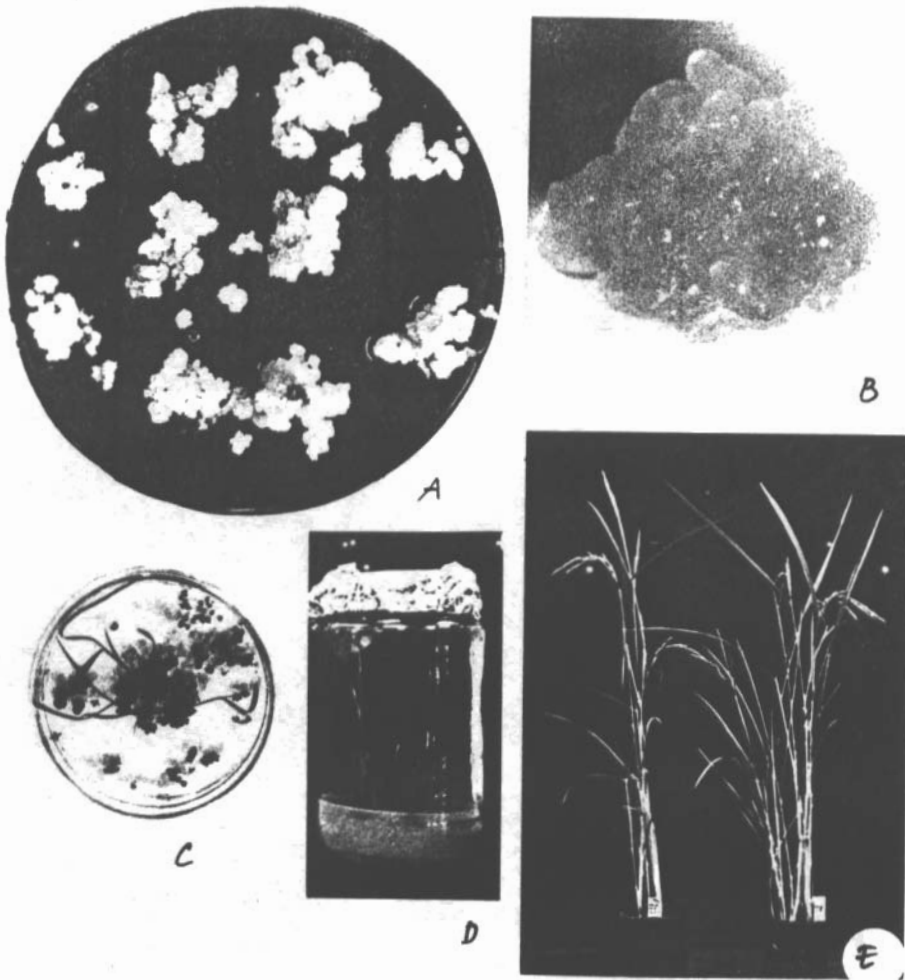
1. Sistem perbanyakan kalus embriogenik padi (globular, translusens, kering) telah diperoleh untuk tanaman padi varietas IR 64, Cisadane dan Rajelele KA.
2. Pengirisan skutelum menjadi 4 pada umur 7 hari setelah germinasi meningkatkan jumlah total kalus embriogenik secara nyata.
3. Untuk jenis penembak DNA yang digunakan peletakan target penembakan pada level 1 lebih baik dibandingkan level 2.
4. Umur skutelum tidak berpengaruh nyata terhadap persentase kalus yang bereksresi gen *gus-A*.
5. Optimisasi penembakan DNA menunjukkan bahwa jumlah kalus padi yang memberikan ekspresi gen *gus-A* pada penembakan DNA menggunakan gen *gus-A* yang dikendalikan oleh promotor ubiquitin dari jagung (promotor monokotil) dibandingkan dengan gen *gus-A* yang dikendalikan promotor 35 S dari virus kauli mosaik (promotor dikotil) tidak menunjukkan perbedaan.
6. Plasmid mengandung gen chitinase telah diperbanyak.
7. Ko-transformasi telah dilakukan dengan menggunakan plasmid mengandung gen penyeleksi, gen *gna* dan *cry I A(h)* dan gen chitinase dan gen penyeleksi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Christou P, Ford TL & Kofron M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technolog.* 16:957-962.
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405.

- Li L., Qu R, Kochko A, Fauquet C, Beachy RN. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep* 12: 250-255.
- Linsmaer EM dan Skoog F. 1965. Organic growth requirement of tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 18:100-127.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and B-1,3-glucanase *Plant Physiol* 88:936-942.
- Rueb S, Leneman M, Schilperoort RA, Hensgens LAM. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 36:259-264.
- Jain RK, Jain S, Wu R. 1996. Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic indica rice varieties. *Plant Cell Rep.* 15:449-454
- Xu Y., Zhu Q., Panbangred W., Shirasu K., Lamb C. 1996. Regulation, expression and function of a new basic chitinase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 30:387-401.
- Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA, Lamb CJ. 1994. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Bio/technology* 12:807-812.

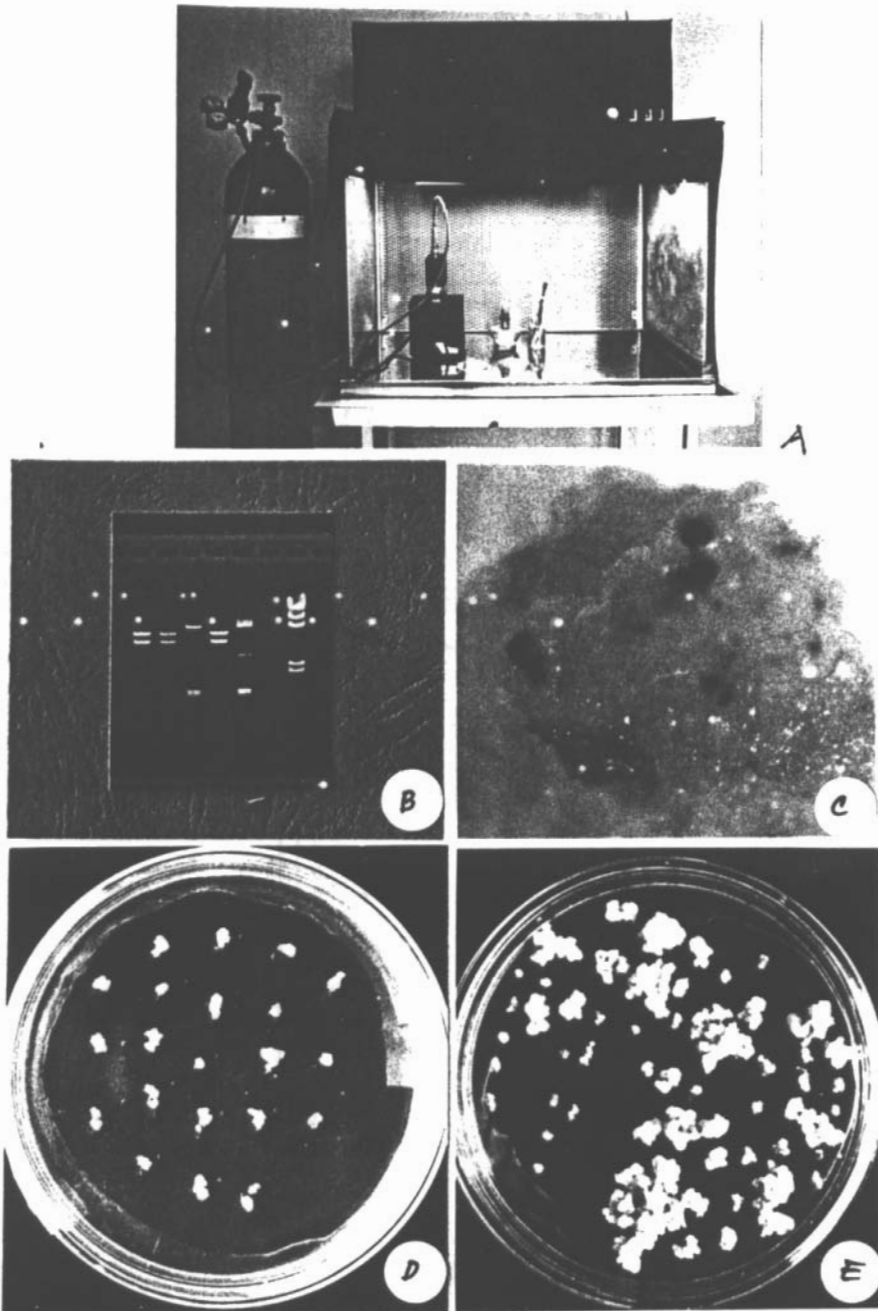




Gambar 1. Regenerasi tanaman dari kalus embriogenik.

- A. Kalus embriogenik pada cawan Petri diberi nomor 1-10
- B. Kalus.
- C. Regenerasi dari kalus.
- D. Planlet.
- E. Tanaman hasil aklimatisasi

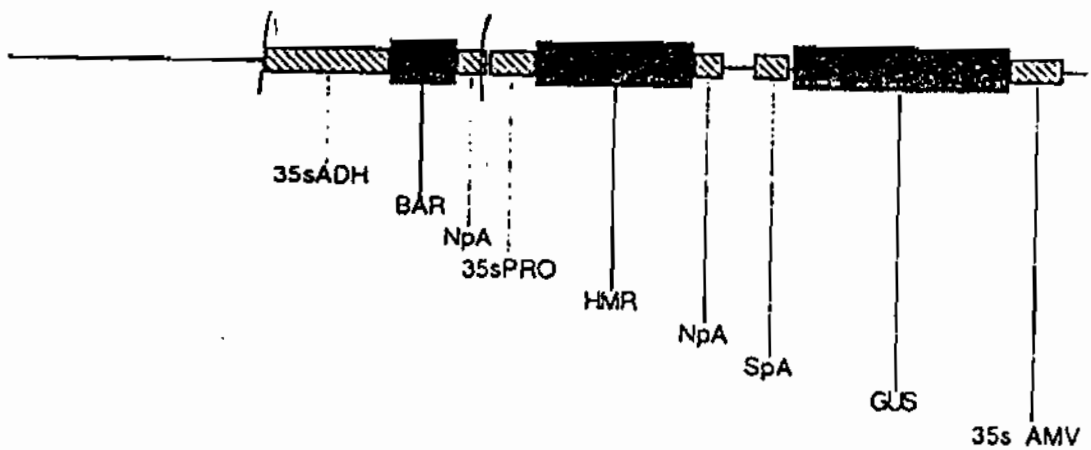
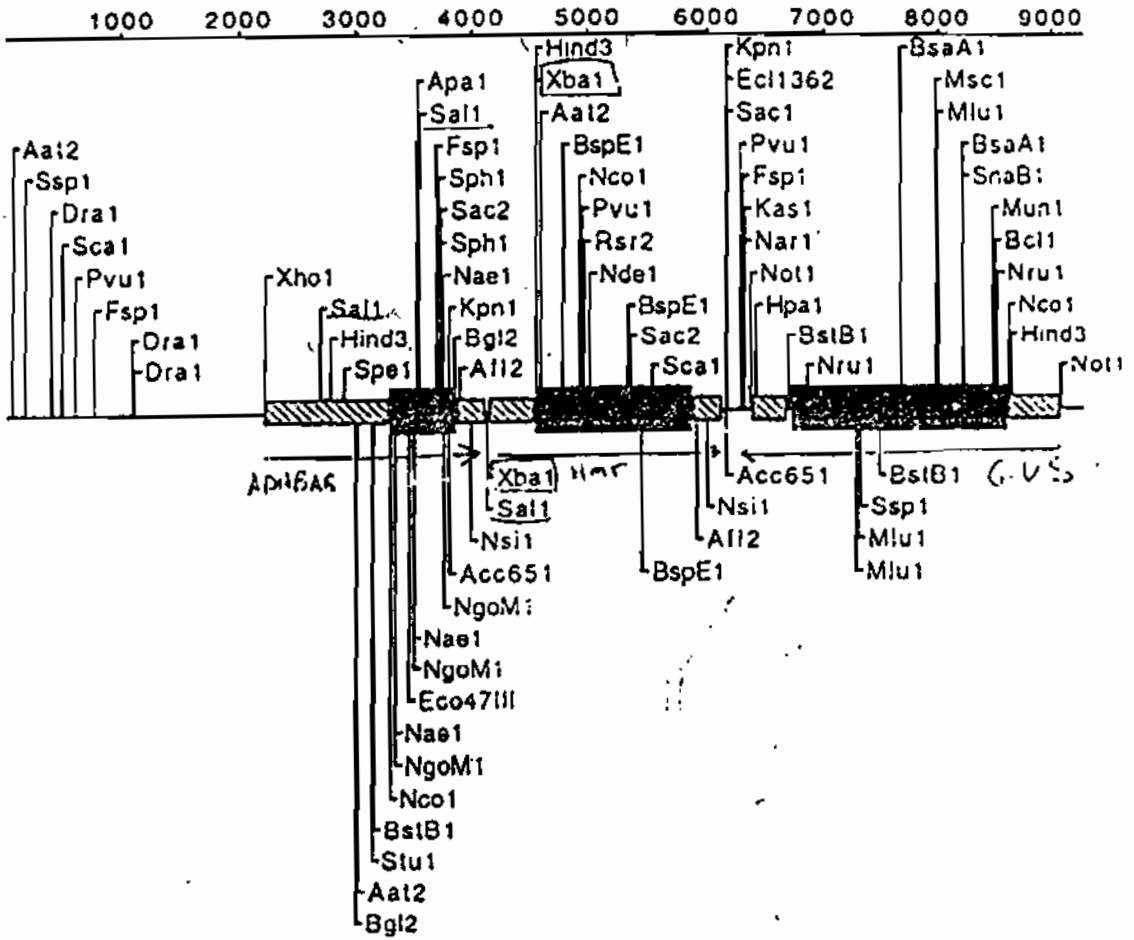
Lampiran 2.



Gambar 2. Penembakan DNA.

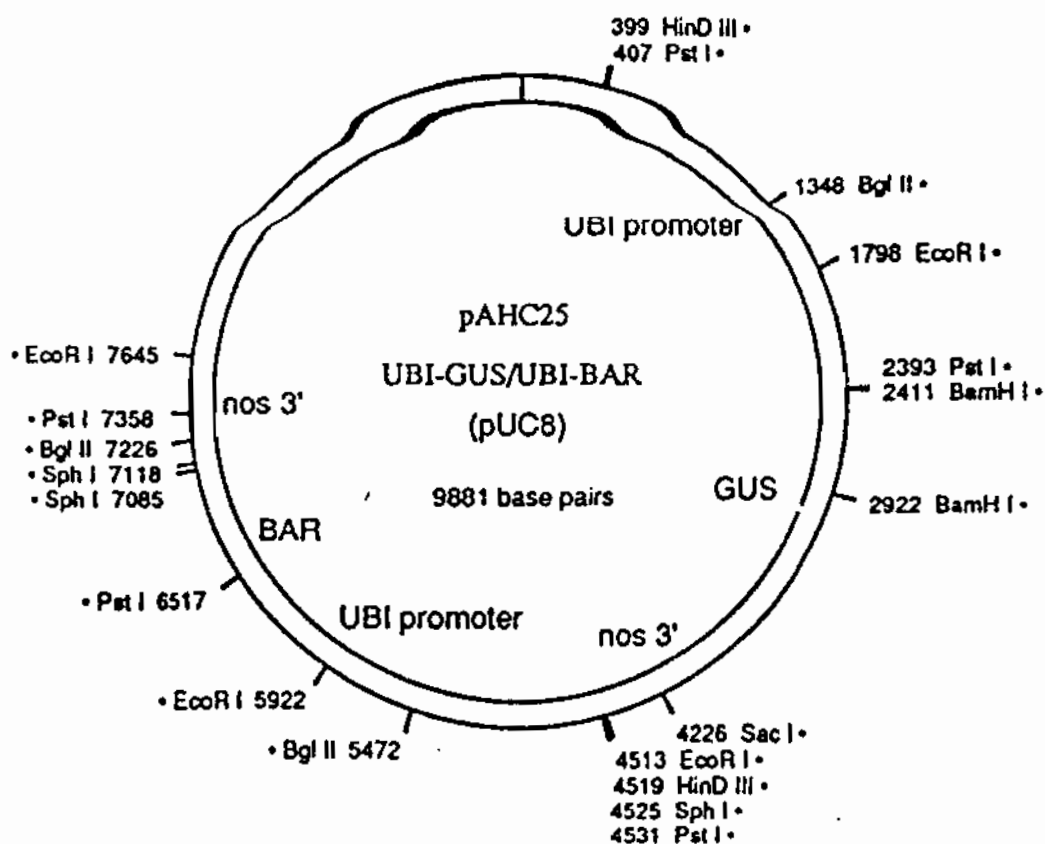
- A. Alat penembak DNA particle inflow gun.
- B. Analisis restriksi dari beberapa plasmid yang diisolasi.
- C. Kalus yang ditembak setelah diuji GUS.
- D. Kalus yang tidak tahan terhadap higromisin
- E. Kalus yang tahan terhadap higromisin.

Experiment 3. Plasmid pPC 100



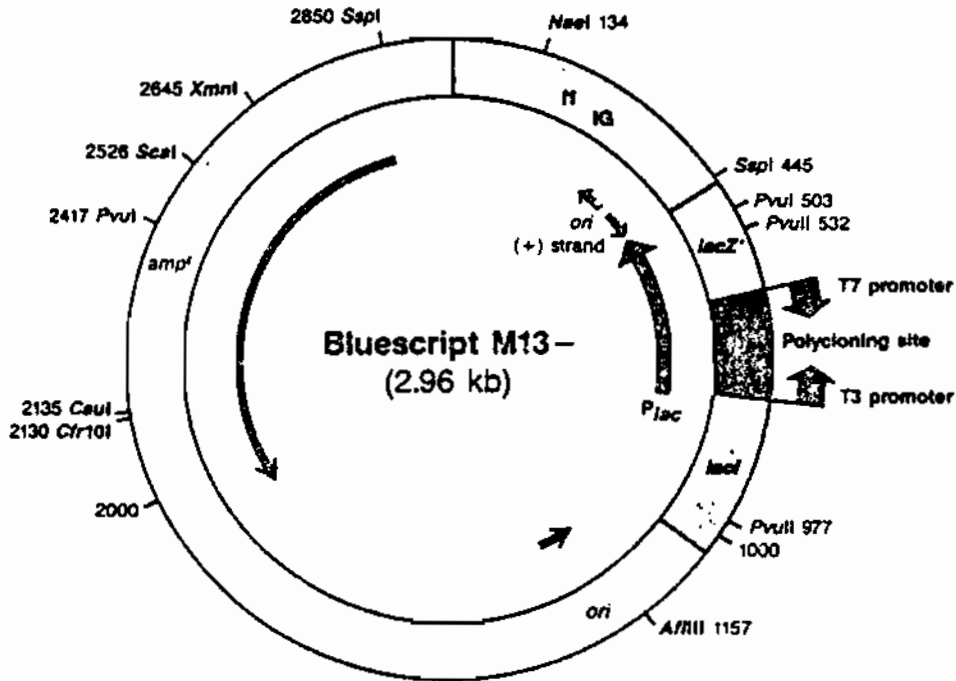
# UBIpro-GUS / UBIpro-BAR

## Screenable and Selectable Markers

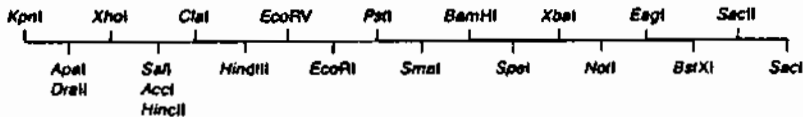


mpiran 5. Plasmid pBS (blue script) sebagai tulang punggung pCHI II.

References: Bluescript M13-: Short et al. (1988) and the product literature from Stratagene Cloning Systems.

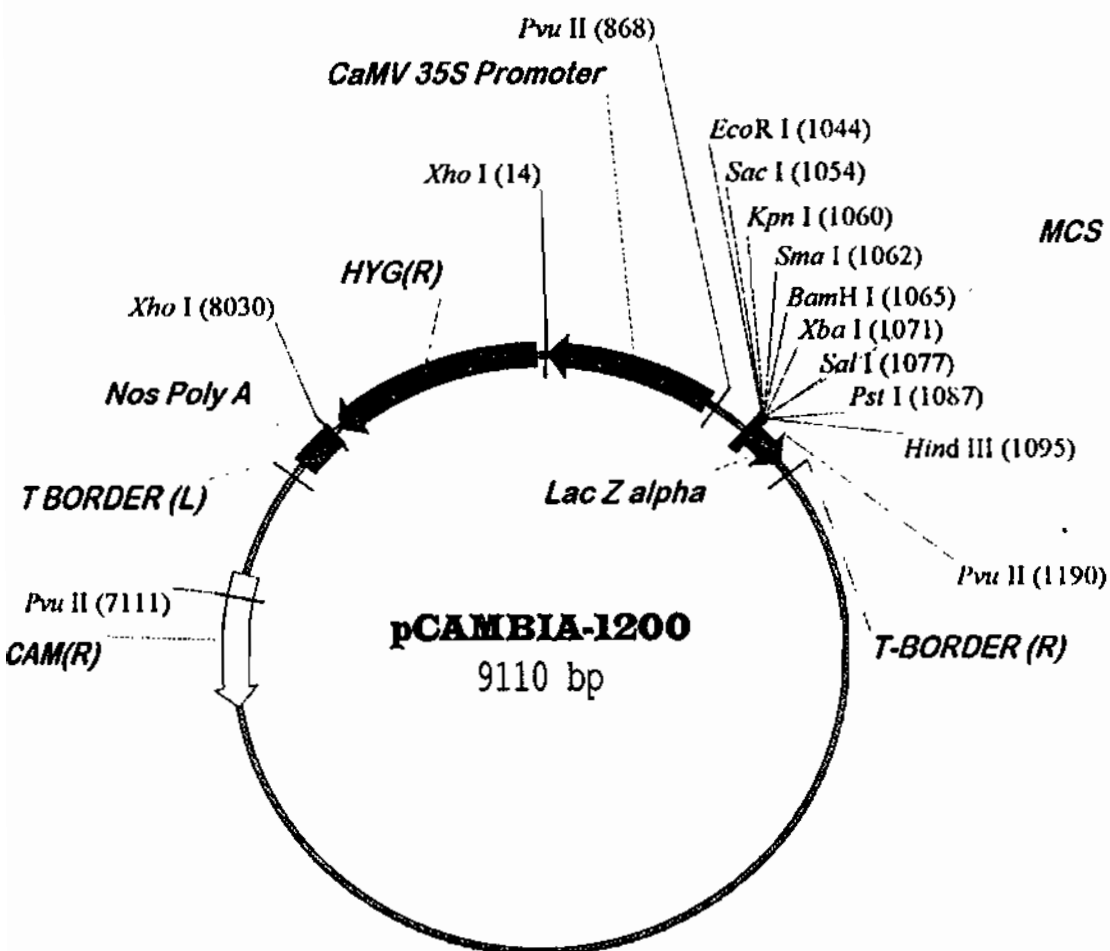


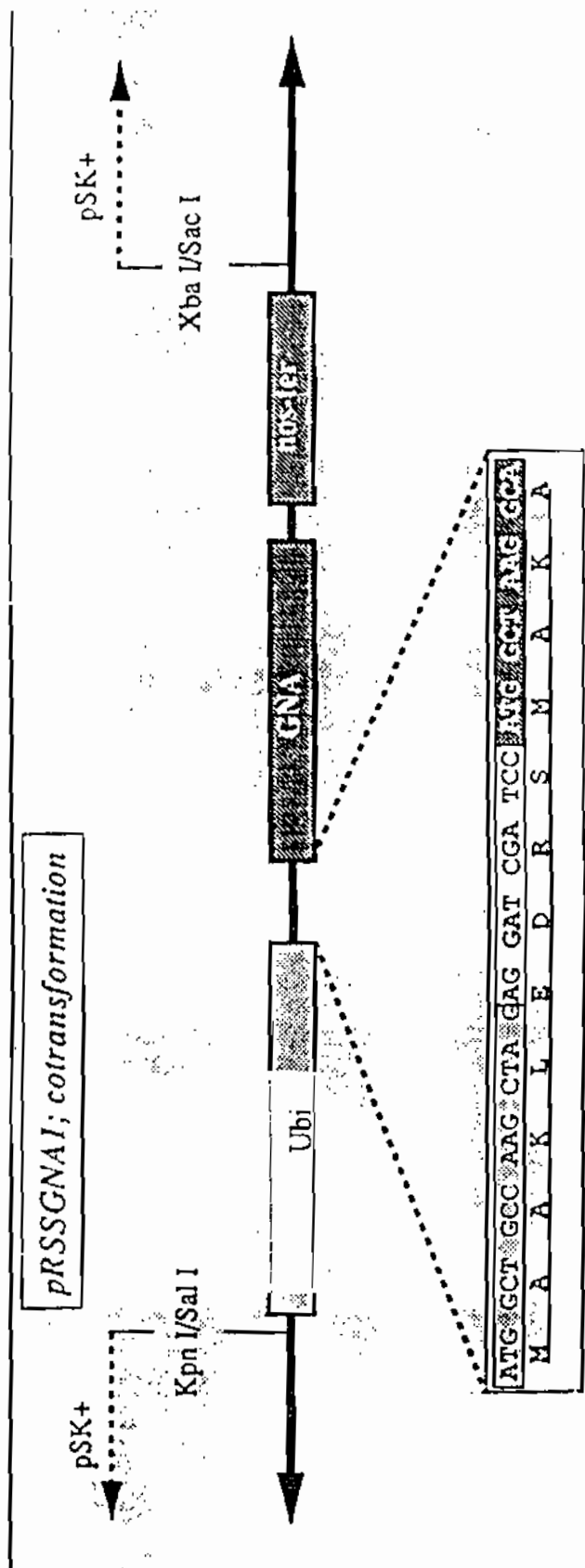
Polycloning Site



In Bluescript SK (M13-), the SacI site lies immediately downstream from the bacteriophage T3 promoter and the KpnI site lies immediately downstream from the bacteriophage T7 promoter. In Bluescript KS (M13-), the polycloning site is in the opposite orientation.

6. Plasmid pCambia 1200.

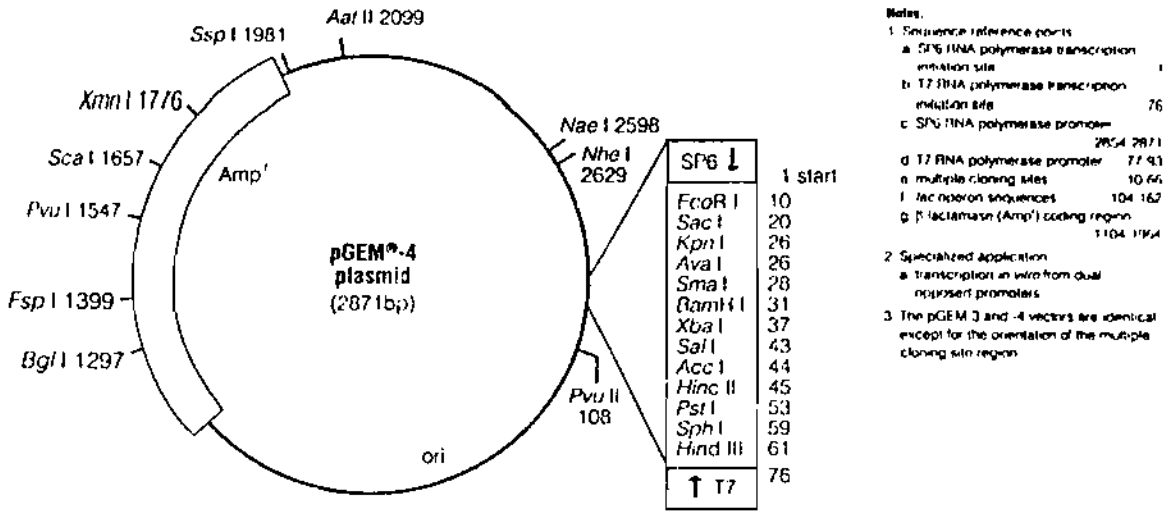








piran 9. Plasmid pGEM-4 sebagai tulang punggung plasmid Cry I A(b).



- Notes.**
- Sequence reference points
    - SP6 RNA polymerase transcription initiation site 1
    - T7 RNA polymerase transcription initiation site 76
    - SP6 RNA polymerase promoter 2854-2871
    - T7 RNA polymerase promoter 77-93
    - multiple cloning sites 10-66
    - lac operon sequences 104-162
    - $\beta$ -lactamase (Amp<sup>r</sup>) coding region 1104-1194
  - Specialized application
    - transcription in vitro from dual opposit promoters
  - The pGEM 3 and -4 vectors are identical except for the orientation of the multiple cloning site region

Figure 7. pGEM-4 vector circle map.

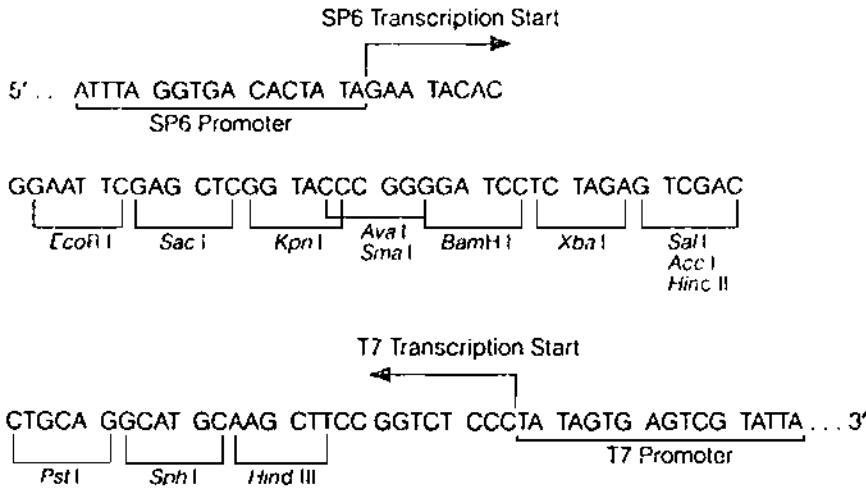


Figure 8. pGEM-4 plasmid promoter and multiple cloning site sequence. The sequence shown corresponds to RNA synthesized by SP6 RNA polymerase and is complementary to RNA synthesized by T7 RNA polymerase.