



**KOMBINASI ZAT PENGATUR TUMBUH & PUTRESIN
TERHADAP DAYA PERBANYAKAN DAN REGENERASI KALUS
ANTERA PADI HITAM**

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Magister Bioteknologi (S2)
dan mencapai gelar Magister Bioteknologi

Oleh:
Anisa Maharani
172520101009

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI
PASCASARJANA
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Tesis ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik;
2. kedua orang tua, Bapak Suharto dan Almh. Ibu Sulistiyani, Adek Perempuan Alda Saharani, dan keluarga besar saya yang tanpa hentinya memberikan semangat dan do'a;
3. semua dosen yang telah memberikan ilmu dan bimbingan yang bermanfaat selama ini,
4. almamater Universitas Jember.

MOTO

“MAN JADDA WAJADA”

Siapa yang bersungguh-sungguh pasti berhasil

“MAN SHABARA ZHAFIRA”

Siapa yang bersabar pasti beruntung

“MAN SARA ALA DARBI WASHALA”

Siapa menapaki jalan-Nya akan sampai ke tujuan

“Khoirunnas anfa’uhum linnas (sebaik-baiknya manusia adalah yang bisa memberi manfaat untuk orang lain)”. (H.R Bukhari)

*) Kutipan Inspirasi Iman (25-04-2013) Ustadz Felix Siau dan Ahmad Fuadi
(Penulis Novel Best Seller Negeri 5 Menara)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anisa Maharani

NIM : 172520101009

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah berjudul “**Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh & Putresin Terhadap Daya Perbanyakan dan Regenerasi Kalus Antera Padi Hitam**” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Januari 2020

Yang menyatakan,

Anisa Maharani

NIM 172520101009

TESIS

**KOMBINASI ZAT PENGATUR TUMBUH & PUTRESIN
TERHADAP DAYA PERBANYAKAN DAN REGENERASI KALUS
ANTERA PADI HITAM**

Oleh
Anisa Maharani
NIM 172520101009

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Tri Handoyo, S.P., Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : Wahyu Indra Duwi Fanata, S.P., M.Sc.,
Ph.D

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Tesis berjudul “Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh & Putresin Terhadap Daya Perbanyak dan Regenerasi Kalus Antera Padi Hitam” telah disetujui pada:

hari, tanggal : Selasa, 21 Januari 2020

tempat : Pascasarjana Bioteknologi Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota

Tri Handoyo, S.P., PhD.
NIP. 197112021998021001

Wahyu Indra Duwi Fanata, S.P., M.Sc.,
Ph.D.
NIP. 198102042015041001

PENGESAHAN

Tesis yang berjudul “Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh & Putresin Terhadap Daya Perbanyakan dan Regenerasi Kalus Antera Padi Hitam” telah memenuhi persyaratan Keputusan Rektor Universitas Jember, nomor 16887/UN25/SP/2017, tanggal 1 November 2017, tentang Deteksi Dini Plagiasi dan Pencegahan Plagiarisme Karya Ilmiah Dosen, Tenaga Kependidikan, dan Mahasiswa Universitas Jember dengan *submission ID 1238042169* serta telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 21 Januari 2020

tempat : Pascasarjana Bioteknologi Universitas Jember

Tim Penguji
Ketua,

Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D.
NIP. 197008101998031001

Anggota I,

Anggota II,

Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., Ph.D.
NIP. 196504261994031001

Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P.
NIP. 196504251990022002

Mengesahkan
Direktur,

Prof. Dr. Ir. Rudi Wibowo, M.S.
NIP 195207061976031006

RINGKASAN

Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) & Putresin Terhadap Daya Perbanyak dan Regenerasi Kalus Antera Padi Hitam; Anisa Maharani, 172520101009; 2020: 60 halaman; Program Magister Bioteknologi Pascasarjana Universitas Jember.

Perakitan varietas unggul dan pengumpulan plasma nutfah padi melibatkan proses pemilihan dan penyimpanan tetua yang memiliki sifat genotip dan fenotipe yang unggul. Aplikasi kultur antera mampu mempercepat perakitan varietas unggul dalam waktu singkat melalui galur murni atau homozigot. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan kultur antera adalah faktor teknis yang meliputi perlakuan suhu rendah dan formulasi regulasi pertumbuhan. Tujuan penelitian ini yaitu untuk memperoleh kombinasi media kultur antera terbaik untuk proses keberhasilan kultur antera berupa kalus yang bisa diregenerasikan menjadi tanaman haploid yang mampu mempercepat perakitan varietas unggul dalam waktu singkat melalui galur homozigot.

Pada penelitian ini menggunakan padi hitam varietas lokal yang ditanam pada pot dan proses perawatan tanaman dilakukan di greenhouse. Setelah masuk fase bunting, malai dengan kriteria panjang mencapai 9-12 cm dipanen dan dilakukan proses perlakuan suhu dingin (Cold Pre-treatment) 4°C selama (0; 4; 8; 10; 12) hari. Proses pembuatan media kultur, sterilisasi media, dan sterilisasi alat dilakukan ketika proses perlakuan suhu dingin dilakukan. Malai disterilisasi dan ditanam pada media induksi kalus dengan formulasi media yang sudah disusun meliputi zat pengatur tumbuh NAA(0,5; 1; 1,5; 2)mg/L, Kinetin(0,25; 0,5) mg/L, dan Putresin(5; 10; 15; 20)µM. Eksplan di inkubasi pada kondisi gelap suhu 28°C selama 30 hari, dan dilakukan pengamatan ukuran kalus, kecepatan pertumbuhan kalus, dan foto dokumentasi/deskripsi. Subkultur dilakukan pada media yang sama atau berbeda untuk menjaga nutrisi pada media kultur tetap terpenuhi untuk pertumbuhan kalus. Untuk Kombinasi media regenerasi meliputi zat pengatur tumbuh NAA (1; 2; 3)mg/L dan BAP (1; 2; 3; 4)mg/L.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa Cold pre treatment terbaik pada suhu 4°C selama 8 hari dengan persentase pertumbuhan kalus antera 20%. Optimasi penambahan 1 mM putresin pada media induksi kalus dengan percepatan pertumbuhan kalus terbaik yaitu 15 µM dan 20 µM. Rata – rata ukuran kalus tertinggi pada masing-masing varietas yaitu HM 1,0477 mm pada kombinasi 1,5 : 0,5, PI 1,0493 mm pada kombinasi 2 : 0,25, HB 0,4877 mm pada kombinasi 2 : 0,25, HL 0,7293 mm pada kombinasi 2 : 0,25 dan HBj 1,1380 mm pada kombinasi 2 : 0,5. Data persentase kalus tertinggi masing-masing varietas yaitu HM 7% pada kombinasi T8 (2:0.5), PI 10% pada kombinasi T8 (2:0.5), HB 26% pada kombinasi T8 (2:0.5), HL 12% pada kombinasi T8 (2:0.5), HBj 5% pada kombinasi T8 (2:0.5). Kecepatan pertumbuhan kalus diperoleh data dengan tiga kali pengamatan dengan

rentang tujuh hari, yaitu HBj 0,0387 mm/h, HM 0,0366 mm/h; PI 0,0329 mm/h; HL 0,0326 mm/h dan HB 0,0161 mm/h.

Tahapan regenerasi kalus menghasilkan data persentase kalus greenspoot, kalus browning, kalus membentuk planlet, dan kalus berakar. Persentase tertinggi untuk kalus hijau yaitu kombinasi T12 (3 NAA : 4 BAP) sebanyak 62,5%. Persentase tertinggi untuk kalus brown yaitu kombinasi T9 (3 NAA :1 BAP) sebanyak 75%. Planlet yang tumbuh dan berwarna hijau yaitu pada kombinasi T12 (3 NAA : 4 BAP) sebanyak 25%. Persentase tertinggi untuk kalus berakar yaitu kombinasi T9 (3 NAA : 1 BAP) sebanyak 50%.

Kesimpulannya adalah dengan perlakuan suhu 4°C selama 8 hari dengan media induksi kalus NAA 2 mg.L⁻¹ + Kinetin 0,5 mg.L⁻¹ + Putresin (15; 20) µM dapat menghasilkan kalus anthera dengan persentase terbaik dan media regenerasi kalus NAA 3 mg/L + BAP 4 mg/L bisa menghasilkan kalus greenspoot dan planlet hijau.



SUMMARY

Combination of Plant Growth Regulators (PGR's) & Putrescine Against Proliferation and Regeneration Callus of Black Rice Anther; Anisa Maharani, 172520101009; 2020: 60 Pages; Study Program of Biotechnology, Post Graduate Program, University of Jember.

The assembly of superior varieties and the collection of rice germplasm involve the process of selecting and storing elders which possess superior genotypic and phenotypic characteristics. Application of anther culture can accelerate the assembly of superior varieties in a short time through pure or homozygous lines. Some factors that can influence the success of anther culture are technical factors which include low temperature treatment and growth regulation formulation. The purpose of this study is to obtain the best anther culture media combination for the success of anther culture in the form of callus which can be regenerated into haploid plants that can accelerate the assembly of superior varieties in a short time through homozygous lines.

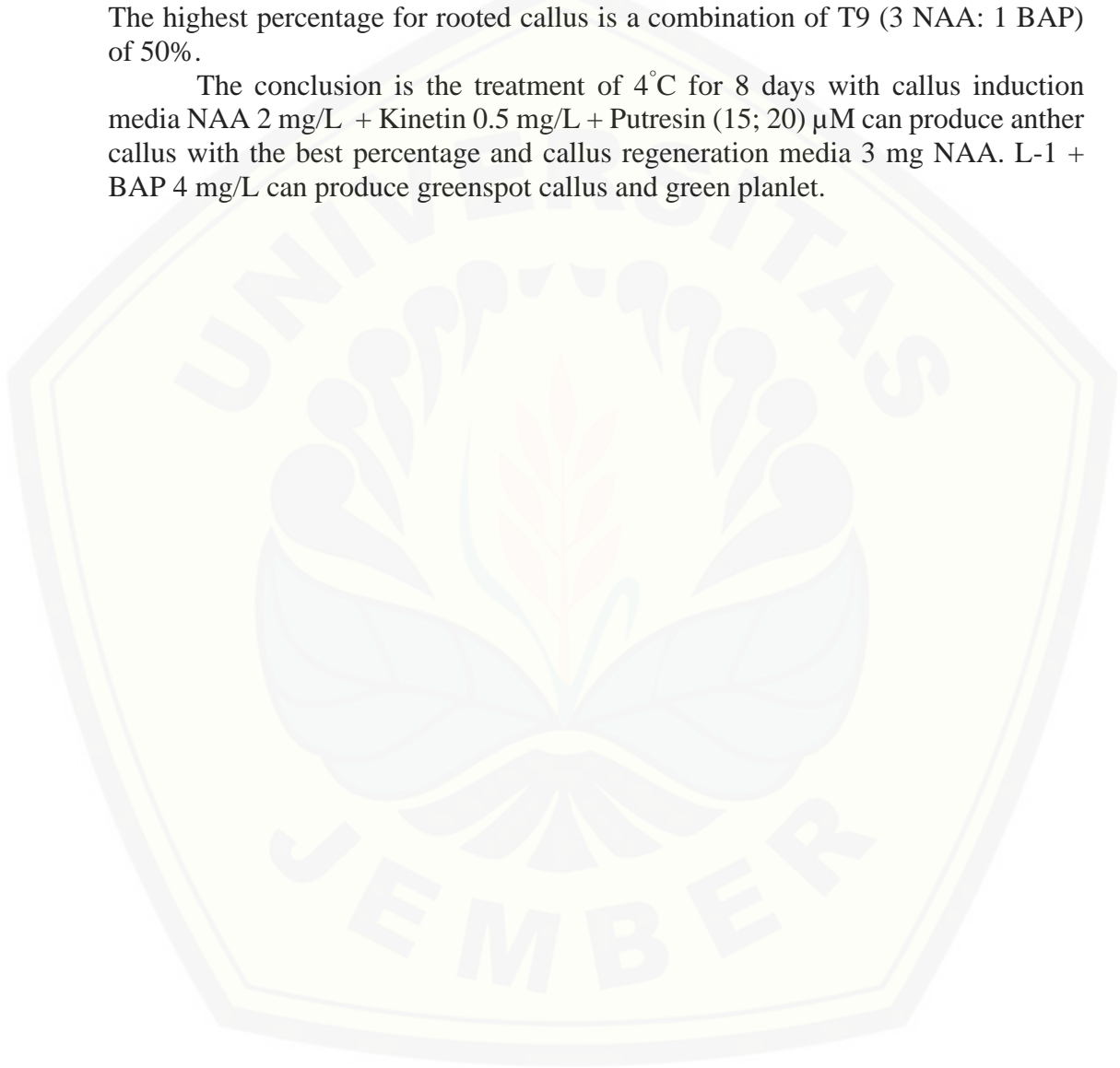
In this study using local varieties of black rice planted in pots and plant maintenance processes carried out in the greenhouse. After entering the booting phase, panicles with length criteria reaching 9-12 cm were harvested and a 4°C cold treatment process was carried out for (0; 4; 8; 10; 12) days. The process of making culture media, media sterilization, and device sterilization is carried out when the process of mild temperature treatment is carried out. Panicle was sterilized and planted on callus induction media with a prepared media formulation including NAA (0.5; 1; 1.5; 2) mg/L, Kinetin (0.25; 0.5) mg. L-1, and Putrescine (0.5; 1; 1.5; 2). Explants were incubated in dark conditions at a temperature of 28°C for 30 days, and observations of callus size, callus growth rate, and photo documentation / description were carried out. Subcultures are carried out on the same or different media to keep the nutrients in the culture media still available for callus growth. For the regeneration media combination includes NAA (0.25; 0.5; 0.75) mg/L and BAP (1; 2; 3; 4) mg/L.

The results of this study indicate that Cold Pre treatment is best at 4°C for 8 days with 20% anther callus growth. Optimization of the addition of 1 mM putrescine on callus induction media with the best acceleration of callus growth is 1.5 µM and 2 µM. The highest average callus size in each variety was HM 1.0477 mm in a combination of 1.5: 0.5, PI 1.0493 mm in a combination of 2: 0.25, HB 0.4877 mm in a combination of 2: 0, 25, HL 0.7293 mm in the 2: 0.25 combination and HBj 1.1380 mm in the 2: 0.5 combination. The highest callus percentage data for each variety are 7% HM in combination T8 (2: 0.5), PI 10% in combination T8 (2: 0.5), HB 26% in combination T8 (2: 0.5), HL 12% in combination T8 (2: 0.5), HBj 5% in combination T8 (2: 0.5). The growth rate of callus obtained data with

three times savings with a span of seven days, namely HBj 0.0387 mm / h, HM 0.0366 mm / h; PI 0.0329 mm / h; HL 0.0326 mm / h and HB 0.0161 mm / h.

Stages of callus regeneration produced data on percentage of callus greenspot, callus browning, callus forming plantlets, and rooted callus. The highest percentage for green callus is a combination of T12 (3 NAA: 4 BAP) of 62.5%. The highest percentage for callus brown is a combination of T9 (3 NAA: 1 BAP) of 75%. Plantlets that grow and turn green are 25% T12 (3 NAA: 4 BAP). The highest percentage for rooted callus is a combination of T9 (3 NAA: 1 BAP) of 50%.

The conclusion is the treatment of 4°C for 8 days with callus induction media NAA 2 mg/L + Kinetin 0.5 mg/L + Putresin (15; 20) µM can produce anther callus with the best percentage and callus regeneration media 3 mg NAA. L-1 + BAP 4 mg/L can produce greenspot callus and green plantlet.



PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) & Putresin Terhadap Daya Perbanyakan dan Regenerasi Kalus Antera Padi Hitam”. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) Program Studi Magister Bioteknologi Pascasarjana Universitas Jember.

Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Rudi Wibowo, M.S., selaku Direktur Pascasarjana Universitas Jember;
2. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D., selaku Ketua Program Studi Magister Bioteknologi Universitas Jember dan Dosen Pembimbing Akademik;
3. Tri Handoyo, S.P., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan tesis, serta membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Wahyu Indra Duwi Fanata, S.P., M.Agr., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam penulisan tesis ini;
5. Kedua orang tua (Bapak Suharto dan Almh. Ibu Sulistiyani), Adik perempuan Alda Saharani, dan sekeluarga yang telah memberikan dorongan semangat dan do'anya demi terselesaikannya tesis ini;
6. DRPM Kemenristekdikti yang telah membiayai penelitian melalui Hibah Tesis Magister Kementerian Ristek Dikti 2019 atas nama Tri Handoyo, S.P., Ph.D.
7. Kawan-kawan TH Team “Rice and Molecular Breeding”
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Jember, Januari 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
PRAKATA	xii
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Penelitian	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Padi Hitam	4
2.2 Deskripsi 5 Varietas Padi Hitam yang Digunakan	5
2.3 Perbanyakkan Tanaman dengan Kultur Jaringan	7
2.4 Pemuliaan Tanaman Padi Teknik Haploidi (Kultur Antera Padi)	7
2.5 Media Kultur Jaringan	10
2.6 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	11
2.7 Putresin	12
2.8 Hipotesis	14

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	15
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	15
3.2.1 Alat	15
3.2.2 Bahan	15
3.3 Rancangan Percobaan.....	15
3.4 Pelaksanaan Percobaan.....	17
3.4.1 Pembuatan Stok Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	17
3.4.1.1 Stok NAA (Naphtalene acetic acid)	17
3.4.1.2 Stok Kinetin	18
3.4.1.3 Stok BAP (Benzyl amino purin).....	18
3.4.1.4 Stok Putresin (1 mM)	18
3.4.2 Pembuatan Media	19
3.4.2.1 Media Induksi Kalus.....	19
3.4.2.2 Media Regenerasi Kalus	19
3.4.3 Persiapan Tanaman	19
3.4.4 Sterilisasi Ruang, Alat, Bahan, & Media	20
3.5 Kultur Antera.....	20
3.5.1 Persiapan Antera	20
3.5.2 Optimasi Perlakuan suhu (Cold Pre-treatment)	20
3.5.3 Sterilisasi Eksplan (Antera)	20
3.5.4 Induksi Kalus	21
3.5.5 Regenerasi Kalus	22
3.6 Analisis Data	23
3.7 Alur Penelitian	24
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1 Hasil	25
4.1.1 Pengaruh Lama Inkubasi Suhu Dingin	25
4.1.2 Induksi Kalus Antera	26
4.1.3 Optimasi Penambahan Putresin	29
4.1.4 Daya Perbanyak dan Kecepatan Tumbuh Kalus.....	30

4.1.5 Kalus Embriogenik & Non-embriogenik.....	32
4.1.6 Regenerasi Kalus	33
4.2 Pembahasan	35
4.2.1 Pengaruh Lama Inkubasi Pada Suhu Dingin	35
4.2.2 Induksi Kalus Antera	37
4.2.3 Optimasi Penambahan Putresin	40
4.2.4 Kalus Embriogenik & Non-embriogenik.....	42
4.2.5 Regenerasi Kalus	43
4.2.6 Prospek Aplikasi Masa Depan	46
BAB 5 PENUTUP.....	47
5.1 Kesimpulan	47
5.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR TABEL

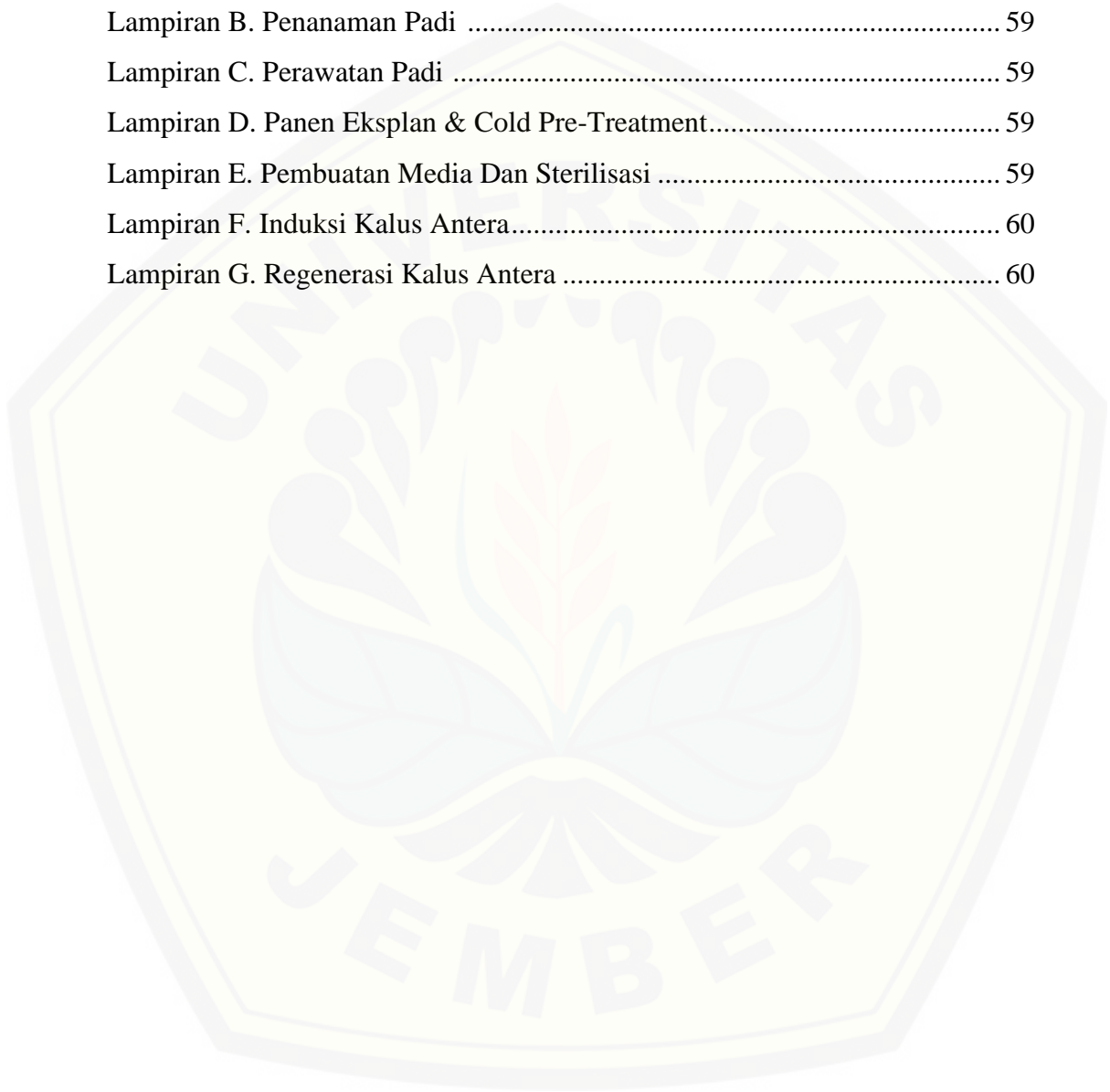
	Halaman
Tabel 3.1 Waktu lama <i>Cold pre-treatment</i>	16
Tabel 3.2 Kombinasi Media Induksi Kalus	16
Tabel 3.2 Kombinasi Media Induksi Kalus Terbaik + Putresin.....	16
Tabel 3.3 Kombinasi Media Regenerasi Kalus	17
Tabel 4.1 Karakter Agronomi Lima Varietas Padi Hitam Lokal	25
Tabel 4.2 Efek perlakuan suhu dingin (Cold Pre-Treatment 4°C)	26
Tabel 4.3 Rata -rata ukuran diameter dan jumlah kalus lima varietas padi hitam pada media induksi kalus	27
Tabel 4.4 Pertumbuhan & jumlah kalus pada media induksi dengan penambahan putresin varietas Hitam Bantul (HB)	29
Tabel 4.5 Panjang kalus lima varietas padi hitam pada media 2 mg/L NAA + 0,5 mg/L kinetin + 20 µM putresin	30
Tabel 4.6 Morfologi kalus lima varietas padi hitam 3x pengamatan pada media 2 mg/L NAA + 0,5 mg/L kinetin + 20 µM putresin	31
Tabel 4.7 Perbedaan kalus embriogenik dan non-embriogenik pada lima varietas padi hitam	32
Tabel 4.8 Pengaruh NAA & BAP terhadap pembentukan kalus pada kombinasi media terhadap diferensiasi kalus	33

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tipe Bulir Padi Hitam China dengan atau tanpa kulit gabah.....	4
Gambar 2.2 Tahapan Kultur Anther Untuk Pemuliaan Padi	8
Gambar 2.3 Diagram Pedoman Umum Metode Kultur Anther.....	10
Gambar 3.1 Alur Penelitian	24
Gambar 4.1 Posisi Anther pada Spikelet	24
Gambar 4.2 Persentase terbentuknya kalus pada media induksi.....	28
Gambar 4.3 Persentase kalus regenerasi varietas Hitam Bantul (HB).....	35
Gambar 4.4 Proses regenerasi kalus menjadi planlet.....	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Lima Varietas Padi Hitam	55
Lampiran B. Penanaman Padi	59
Lampiran C. Perawatan Padi	59
Lampiran D. Panen Eksplan & Cold Pre-Treatment.....	59
Lampiran E. Pembuatan Media Dan Sterilisasi	59
Lampiran F. Induksi Kalus Antera.....	60
Lampiran G. Regenerasi Kalus Antera	60



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pemilihan tetua unggul yang homozigot sangat diperlukan dalam melakukan proses persilangan tanaman padi hitam. Program pemuliaan saat ini memiliki target utama untuk memproduksi varietas unggul, berkualitas, dan berkuantitas tinggi. Kualitas yang diutamakan dalam program tersebut yaitu merakit tanaman padi hitam yang mengandung nutrisi tinggi seperti antosianin (Kristamtini *et al.*, 2012), vitamin dan vitamin B kolpleks (Ichikawa *et al.*, 2001; Sompong *et al.*, 2011; Jang *et al.*, 2012), dan amilosa (Narwidina, 2009).

Usaha untuk mendapatkan karakter superior dapat dilakukan dengan mengembangkan proses seleksi terhadap sifat genotip dan fenotip tetuanya. Pengembangan varietas padi hitam tersebut memiliki beberapa kendala yaitu produksinya rendah dan umur tanaman yang relatif panjang. Sehingga perlu melakukan persilangan atau pemuliaan padi yang memiliki keunggulan tahan terhadap cekaman abiotik dan biotik (Sasmita *et al.*, 2007). Tujuan dari pemuliaan ini agar dapat merakit varietas baru dan diharapkan lebih baik dan unggul dari varietas yang sudah ada sebelumnya.

Proses pemuliaan ini bisa dilakukan dengan teknik konvensional dan kultur jaringan. Proses pemuliaan tanaman padi konvensional membutuhkan waktu lama sekitar 6-8 generasi tanaman (Lestari *et al.*, 2009). Teknik kultur jaringan melalui kultur antera padi memiliki keunggulan yang bisa mempersingkat 1-2 generasi tanaman (Dewi *et al.*, 2012). Galur murni yang diperoleh melalui tanaman haploid dengan homozigositas tinggi dapat diproduksi dan diperoleh pada generasi pertama dalam waktu tanam tidak lebih dari satu tahun (Zapara *et al.*, 2004). Hal ini dapat meningkatkan efektivitas proses seleksi pemuliaan tanaman bila dibandingkan dengan teknik konvensional.

Ada beberapa kekurangan kultur antera yaitu memiliki resiko membentuk sifat resesif, namun akan berbeda jika kondisinya normal. Kekurangan lain dari kultur antera yaitu persentase reproduksi akan kecil, terutama pada generasi awal tanaman yang dihasilkan akan banyak biji yang tidak bernas / kopong.

Ada beberapa faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan kultur anthera, yaitu faktor genotip tanaman dan faktor teknis. Padi hitam varietas lokal termasuk dalam padi subspecies indica, dimana memiliki genotip rekalsitran. Sifat rekalsitran tersebut bisa menghambat proses pembentukan kalus melalui kultur in vitro. Faktor teknis yang berpengaruh seperti perlakuan suhu pada eksplan dan komposisi media kultur. Perlakuan suhu yaitu suhu dingin (Cold pre-treatment) bertujuan untuk menunda proses penuaan (senescence) pada dinding sel anthera dan meningkatkan pembelahan mikrospora (Gueye and Nidr, 2010; Sen *et al.*, 2001). Komposisi media kultur meliputi zat pengatur tumbuh (Chung *et al.*, 1996), sumber karbon atau gula (Bishnoi, *et al.*, 2000), inhibitor etilen seperti senyawa poliamin (Dewi *et al.*, 2004). Sumber karbon atau gula yang bisa digunakan dalam media kultur yaitu sukrosa, fruktosa, maltosa. Penggunaan maltosa memberikan hasil terbaik jika dibanding dengan sukrosa dan fruktosa atau jenis gula lainnya (Bishnoi *et al.*, 2000). Poliamin adalah salah satu senyawa yang berfungsi sebagai inhibitor etilen. Poliamin terutama putresin dapat mencegah proses degradasi membran sitoplasma dan konsentrasi senyawa etilen secara berlebihan sehingga bisa membantu penundaan senescence (Tubircio *et al.*, 1993).

Penelitian ini dilakukan untuk mengoptimalkan beberapa komposisi media kultur dengan kombinasi zat pengatur tumbuh, sumber karbon atau gula, dan poliamin untuk keberhasilan kultur anthera beberapa varietas padi hitam khususnya suspecies indica. Oleh karena itu penting dilakukan optimasi pada beberapa komposisi media dengan kombinasi hormon dengan penambahan putresin yang sesuai terhadap keberhasilan kultur anthera padi hitam. Berdasarkan uraian diatas perlu dilakukan penelitian dengan judul “Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh & Putresin Terhadap Daya Perbanyakan dan Regenerasi Kalus Anthera Padi Hitam.”

1.2 Rumusan Masalah

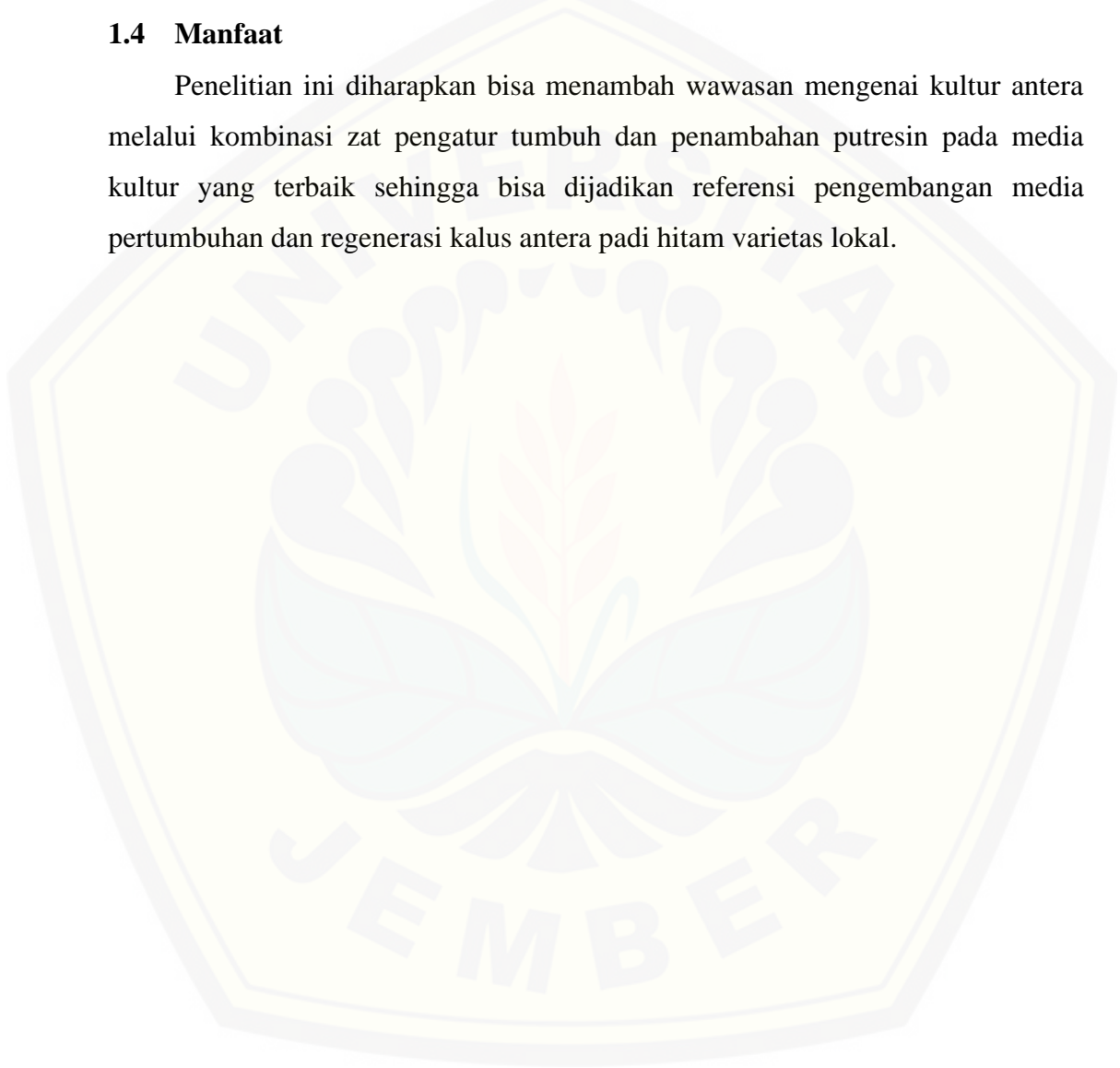
Kultur anthera tanaman padi hitam belum diketahui komposisi media meliputi zat pengatur tumbuh dan penambahan putresin yang tepat dalam optimasi tersebut. Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi in vitro, sehingga diperoleh kombinasi yang optimal sebagai media perbanyakan dan regenerasi kalus anthera padi hitam.

1.3 Tujuan

Media kultur dengan komposisi beberapa zat pengatur tumbuh dan penambahan putresin diharapkan bisa menjadi media pertumbuhan dan regenerasi kalus, sehingga diperoleh kombinasi media kultur yang optimal untuk pertumbuhan dan regenerasi kalus dari antera padi hitam varietas lokal.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan bisa menambah wawasan mengenai kultur antera melalui kombinasi zat pengatur tumbuh dan penambahan putresin pada media kultur yang terbaik sehingga bisa dijadikan referensi pengembangan media pertumbuhan dan regenerasi kalus antera padi hitam varietas lokal.



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Padi Hitam

Padi hitam adalah salah satu varietas lokal yang memiliki rasa, kandungan pigmen paling baik dengan tampilan yang unik dan spesifik. Padi hitam memiliki warna berbeda akibat perbedaan secara genetik untuk mengatur warna endosperma, komposisi pati pada endosperma dan aleuron (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2009). Padi hitam mempunyai kandungan serat pangan (*dietary fiber*) dan hemiselulosa masing-masing sebesar 7,5 % dan 5,8 %, sedangkan padi selain padi hitam hanya sebesar 5,4 % dan 2,2 % (Narwidina, 2009; Saadah *et al.*, ; 2013). Kandungan amilosa pada padi biasa berkisar 20% dan sedikit aleuron sehingga warnanya sedikit transparan. Padi hitam memiliki warna lebih gelap karena bukan hanya aleurone tetapi endosperma juga memproduksi antosianin dengan intensitas tinggi.



Gambar 2.1 Tipe Bulir Padi Hitam China dengan atau tanpa kulit gabah (Sumber : Kushwaha, 2016).

Cina membudidayakan padi hitam paling banyak diikuti oleh Srilanka, Indonesia, India, Filipina, dan negara- negara lain (Pengkumsri, *et al.*, 2015). Khasiat yang baik dimiliki oleh padi hitam bila dibandingkan dengan padi biasa, padi merah, atau padi warna lain (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2009). Padi hitam khususnya kaya akan pigmen antosianin, fitokimia, protein, vitamin (Ichikawa *et al.*, 2011; Sompong *et al.*, 2011) serta senyawa anti radikal bebas (Pengkumsri *et al.*, 2015).

Antosianin utama dalam padi hitam adalah cyanidin-3-glucoside (C3G) yang merupakan sumber antosianin penting di Asia (Pengkumsri *et al.*, 2015). Selain itu, padi hitam mengandung fitokimia aktif seperti tokoferol, tocotrienol, oryzanols, vitamin B kompleks, dan senyawa fenolik (Jang *et al.*, 2012).

Padi hitam lebih dikenal dengan kandungan antioksidannya yang sangat penting untuk peningkatan memori dan memperkuat sistem imun (Choi *et al.*, 2007). Khasiat yang dimiliki padi hitam diantaranya dapat mencegah gangguan fungsi ginjal, daya tahan tubuh meningkat terhadap penyakit, perbaikan sel-sel hati yang rusak (Hepatitis dan Sirosis), pencegahan terhadap tumor atau kanker, memperlambat proses penuaan, untuk sumber antioksidan, mencegah anemia, dan membersihkan kolesterol dalam darah. Kandungan protein pada padi hitam lebih rendah bila dibandingkan dengan kandungan besinya yang cukup tinggi yaitu 15,52 ppm, dan lebih tinggi dari varietas Cisadane, IR64, Pandanwangi, Ciherang, Batang Gadis dan Sintanur yang kandungan besinya berkisar antara 2,9-4,4 ppm (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, 2009).

2.2 Deskripsi 5 Varietas Padi Hitam yang Digunakan

Varietas padi hitam yang digunakan sebanyak 5 varietas. Seluruh benih padi hitam diperoleh dari Balai Besar Penelitian Tanaman Padi Balitbangtan Kementerian Pertanian (BBPADI). Deskripsi 5 varietas padi hitam sebagai berikut :

Hitam Melik (HM)

Hitam Melik adalah varietas padi hitam lokal yang berasal dari daerah Kulon Progo, Yogyakarta. Secara umum tanaman padi hitam melik memiliki ciri-ciri gabah kuning kecoklatan. Warna berasnya hitam terutama pada aleuronnya. Bentuk gabah Hitam Melik ramping dengan ukuran panjang 1,39 cm dan lebar gabah 0,45 cm. Tekstur nasi Hitam Melik setelah dimasak yaitu agak pulen dan memiliki rasa yang enak. Varietas ini dilepas pada tahun 2016 (Abidin, 2018).

Pari Ireng (PI)

Pari Ireng adalah varietas padi hitam lokal yang berasal dari daerah Yogyakarta. Secara umum padi Pari Ireng memiliki ciri-ciri gabah dengan warna kuning jerami. Warna berasnya hitam terutama pada aleuronnya. Bentuk gabah Pari Ireng ramping dengan ukuran panjang 1,45 cm dan lebar gabah 0,48 cm. Tekstur nasi Pari Ireng setelah dimasak yaitu agak pulen dan memiliki rasa yang enak. Varietas ini dilepas pada tahun 2016 (Abidin, 2018).

Hitam Bantul (HB)

Hitam Bantul adalah varietas padi hitam lokal yang berasal dari daerah Bantul, Yogyakarta. Secara umum padi Hitam Bantul memiliki ciri-ciri gabah dengan warna kuning dengan bercak ungu. Warna berasnya hitam terutama pada aleuronnya. Bentuk gabah Hitam Bantul ramping dengan ukuran panjang 1,45 cm dan lebar gabah 0,47 cm. Tekstur nasi Hitam Bantul setelah dimasak yaitu agak pulen dan memiliki rasa yang enak. Varietas ini dilepas pada tahun 2016 (Abidin, 2018).

Hare Lahok (HL)

Hare Lahok adalah varietas padi hitam lokal yang berasal dari daerah Timor Nusa Tenggara. Secara umum padi Hare Lahok memiliki ciri-ciri gabah dengan warna kuning dengan bercak ungu. Warna berasnya hitam kecoklatan. Bentuk gabah Hare Lahok sedang dengan ukuran panjang 1,22 cm dan lebar gabah 0,52 cm. Tekstur nasi Hare Lahok setelah dimasak yaitu agak pulen dan memiliki rasa yang enak (Abidin, 2018).

Hitam Banjarnegara (HBj)

Hitam Banjarnegara adalah varietas padi hitam lokal yang berasal dari daerah Banjarnegara, Jawa Tengah. Secara umum padi Hitam Banjarnegara memiliki ciri-ciri gabah dengan warna kuning jerami. Warna berasnya hitam terutama pada aleuronnya. Bentuk gabah Hitam Banjarnegara sedang dengan ukuran panjang 1,46 cm dan lebar gabah 0,40 cm. Tekstur nasi Hitam Banjarnegara setelah dimasak yaitu agak pulen dan memiliki rasa yang enak (Abidin, 2018).

2.3 Perbanyak Tanaman dengan Kultur Jaringan

Kultur jaringan adalah suatu teknik untuk budidaya bagian dari tanaman baik itu berupa jaringan, organ, maupun embrio tanaman yang dikulturkan pada media buatan, sehingga mampu beregenerasi dan berdiferensiasi menjadi tanaman yang lengkap, dalam waktu singkat, dalam jumlah banyak, dan memiliki sifat dan karakter yang sama persis dengan induknya (Zulkarnain, 2009). Kultur jaringan juga sering disebut sebagai kultur *in vitro*.

Secara teori kultur jaringan memiliki prinsip dasar bahwa sel-sel tumbuhan memiliki kemampuan beregenerasi membentuk jaringan baru, organ ataupun organisme yang serupa apabila media kultur serta lingkungannya kompatibel (Sandra, 2012). Proses dari eksplan yang dikulturkan bisa sampai membentuk tanaman baru diawali dengan terbentuknya kalus. Kalus adalah suatu massa sel yang tumbuh dari perbanyakan (proliferasi) sel-sel yang tidak terorganisasi dan belum berdiferensiasi. Kalus yang terbentuk pada media kultur dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh dan lingkungan kultur.

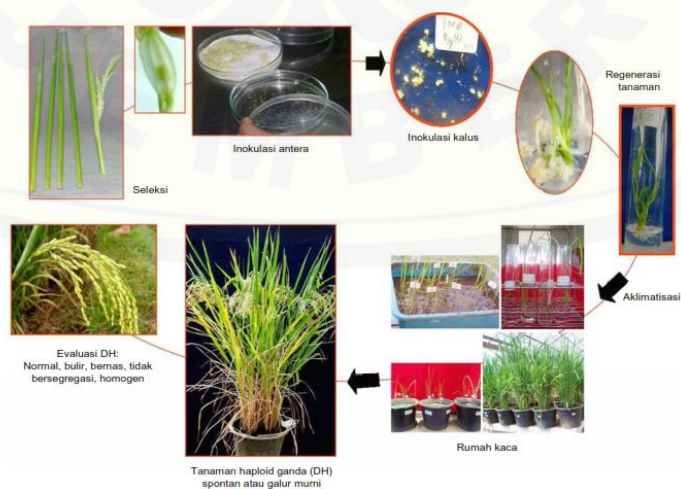
Kultur jaringan memiliki keunggulan selain bisa menghasilkan tanaman dalam waktu singkat, dalam jumlah banyak, dan keseragaman genetik seperti induknya juga bisa dilakukan kapan pun tanpa melihat musim, bibit yang dihasilkan lebih sehat, dapat melakukan manipulasi genetik, tidak membutuhkan lahan atau tempat yang luas, dan biaya lebih murah (Dewi dan Purwoko, 2012). Faktor keberhasilan kultur jaringan yaitu eksplan yang digunakan, zat pengatur tumbuh atau hormon, jenis media kultur, serta lingkungan atau iklim mikro (Shukla *et al.*, 2018) Macam-macam teknik kultur jaringan meliputi, kultur embrio, kultur protoplas, kultur biji steril, kultur tanaman berkayu, kultur antera (kultur haploid), dan kultur lainnya.

2.4 Pemuliaan Tanaman Padi Teknik Haploidi (Kultur Antera Padi)

Teknik haploidi adalah salah satu jenis dari kultur *in vitro* dalam perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan. Teknik haploidi merupakan upaya merakit varietas unggul baru, karena menghasilkan individu tanaman haploid ganda atau *Double Haploid* (DH). Teknik haploid ganda merupakan salah satu metode

yang sangat penting dan bermanfaat untuk proses pemuliaan tanaman (Dunwell, 2010). Khususnya pemuliaan tanaman padi secara konvensional, pelaksanaan kegiatan persilangan dan penyeleksian dilakukan selama 8-10 generasi untuk menghasilkan galur tanaman baru dengan tingkat kestabilan genetik yang tinggi. Proses pemuliaan tanaman dengan memanfaatkan teknik haploid ganda mampu mengurangi jangka waktu seleksi menjadi 1-2 generasi saja (Dewi *et al.*, 1996; Nurhasanah *et al.*, 2016). Produksi galur haploid ganda pada tanaman padi secara umum dilakukan dengan metode kultur anther, sehingga banyak sekali varietas unggul padi yang dihasilkan melalui Teknik haploid ganda (Zapata-Arias *et al.*, 2004). Cina merupakan salah satu negara di Asia yang mengembangkan lebih dari 100 varietas padi baru menggunakan metode kultur anther (Meifang, 1992).

Penerapan teknik kultur anther untuk menghasilkan tanaman haploid ganda dipengaruhi oleh embryogenesis polen. Kondisi lingkungan tumbuh mempengaruhi kualitas tanaman pendonor (Jahne and Lorz, 1995). Kondisi lingkungan tersebut antara lain : kualitas sinar, intensitas sinar, lama penyinaran, unsur hara, dan suhu. Dahleen (1999) melaporkan bahwa tanaman barley yang tumbuh pada kondisi lingkungan terkendali menghasilkan jumlah tanaman haploid ganda lebih banyak. Fase pertumbuhan polen juga sangat berpengaruh terhadap keberhasilan pembentukan kalus. Chung *et al.*, (1996) menyatakan bahwa anther yang berkembang pada tahap awal sampai dengan pertengahan tahap *uni-nucleat* merupakan kondisi optimum untuk digunakan dalam proses penginduksian kalus.

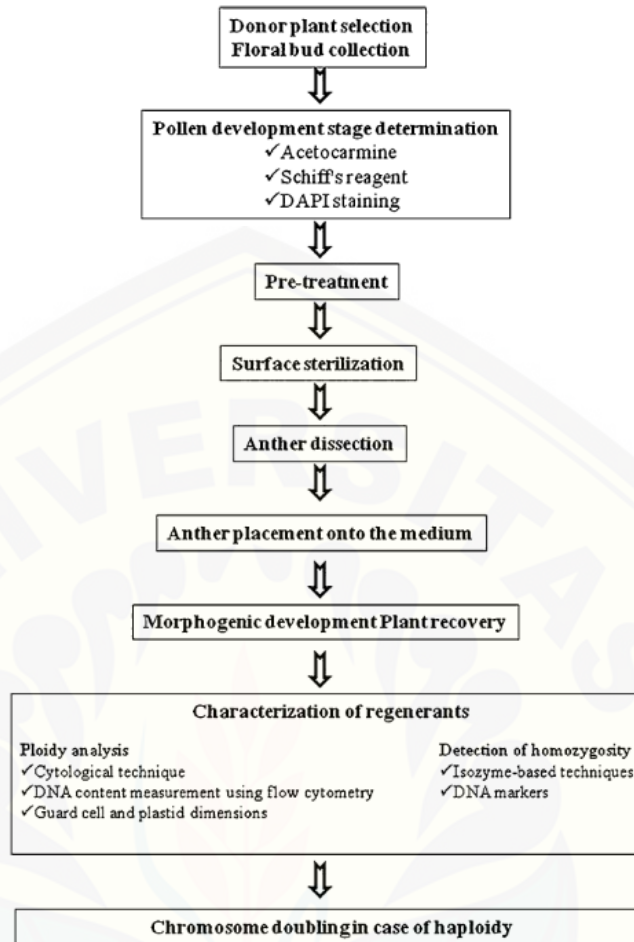


Gambar 2.2 Tahapan Kultur Anther Untuk Pemuliaan Padi (Sumber : Dewi dan Purwoko, 2012).

Faktor lain yang berpengaruh adalah perlakuan suhu rendah serta komposisi media kultur. Kedua faktor tersebut berpengaruh penting terhadap keberhasilan pembentukan tanaman haploid ganda. Suhu rendah menyebabkan penundaan proses *senescence* pada dinding polen selama proses penginduksian kalus atau anther, serta penginduksian keluarnya asam amino dan *heat shock protein* yang berperan dalam proses androgenesis (Xie *et al.*, 1997). Chung *et al.*, (1996) melaporkan bahwa penginkubasian bunga padi pada suhu 8-12°C selama 8-15 hari secara nyata meningkatkan jumlah kalus yang terbentuk. Komposisi media kultur merupakan faktor penting kedua yang menentukan keberhasilan pembentukan tanaman haploid ganda. Sukrosa merupakan sumber karbon yang paling digunakan dalam kultur anyher dengan kisaran konsentrasi 2-4 (Reinert and Bajaj, 1997).

Penelitian lain menyebutkan bahwa penggunaan maltose memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan sukrosa maupun sumber karbohidrat yang lain berkaitan dengan respon penginduksian dalam kultur anther (Bishnoi *et al.*, 2000). Selain itu, pembentukan kalus dan daya regenerasi pada kultur anther pada kultivar Taipei-309 dapat diinduksi dengan penambahan poliamin putrescine sebanyak 1 mM (Dewi *et al.*, 2004).

Meskipun spesies yang berbeda, serta kultivar yang berbeda dalam suatu spesies, menunjukkan persyaratan yang sangat beragam dan tidak ada kondisi standar tunggal atau protokol untuk menginduksi pembentukan tanaman yang berasal dari serbuk sari. Hal tersebut mungkin memberikan pedoman umum untuk kultur anther, seperti yang dirangkum pada Gambar 2.3



Gambar 2.3 Diagram Pedoman Umum Metode Kultur Antera (Sumber : Antonietta, 2011).

2.5 Media Kultur Jaringan

Media kultur jaringan bisa berupa media cair bila tanpa menggunakan agar pematik, semi padat bila menggunakan agar-agar dengan takaran 0,3-0,4% w/v, atau padat dengan takaran 0,6-1,0% w/v. Bahan pematik atau yang biasa dipakai yaitu berupa agar-agar. Contoh dari agar yang sering digunakan yaitu substitusi agar seperti *phytagel* atau *gelrite*. Kelainan fisiologis pada eksplan atau planlet yang disebut hiperhidrasi (vitrifikasi) biasanya diakibatkan oleh bahan pematik sintetik. Untuk mengurangi terjadinya hal tersebut maka perlu ditambahkan agargel yang terbuat dari campuran 1 gram *phytagel* atau *gelrite* dengan 4 gram agar-agar dalam 1 liter media. Media kultur jaringan yang biasa dipakai yaitu LS (Linsmaier and Skoog), MS (Murashige and Skoog), dan N6 (Chu) (Vennapusa *et al.*, 2015).

Vitamin adalah salah satu zat yang dibutuhkan dalam jumlah kecil dan memiliki fungsi katalitik oleh eksplan untuk tumbuh menjadi planlet. Jenis vitamin yang diaplikasikan pada media kultur diantaranya tiamin (vitamin B₁) 0,1-30 mg/L, piridoksin (vitamin B₆), dan asam nikotinat. Untuk meningkatkan pertumbuhan kultur dapat menambahkan tiamin ketika media tersebut mengandung sitokinin dengan konsentrasi rendah. Hal ini terjadi karena pada konsentrasi sitokinin tinggi kultur mampu memproduksi tiamin secara nyata.

Sumber karbon dalam media kultur ada beberapa jenis yaitu sukrosa, maltosa, fruktosa, dan glukosa lainnya. Sumber karbon dalam bentuk gula adalah senyawa esensial dalam media kultur anther untuk proses osmotik dan nutrisi (Bishnoi *et al.*, 2000). Maltosa memiliki keunggulan bahwa setelah terdegradasi atau mengalami proses pemanasan hanya menghasilkan glukosa saja (Khatun *et al.*, 2012). Maltosa telah terbukti sebagai sumber karbon unggul daripada sukrosa untuk androgenesis di beberapa spesies, termasuk tanaman serealia (Last *et al.*, 1990).

Berbeda dengan sukrosa, bila dipanaskan atau bergabung dengan senyawa lain maka akan terdegradasi menjadi glukosa dan fruktosa. Fruktosa yang dihasilkan dari derivat sukrosa tersebut akan menghambat proses androgenesis (Xie *et al.*, 1995). Maltosa memberikan hasil terbaik dibandingkan dengan sukrosa maupun sumber karbon yang lain berkaitan dengan respon penginduksian dalam kultur anther (Bishnoi *et al.*, 2000).

2.6 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat pengatur tumbuh adalah hormon sintetik bukan hara dari luar tubuh tanaman yang ditambahkan kedalam media kultur. Zat pengatur tumbuh yang baik dalam jumlah sedikit dapat mendukung maupun menghambat dan merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh memiliki peran penting dalam keberhasilan kultur jaringan selain dari eksplan yang digunakan (Dewi *et al.*, 2006). Zat pengatur tumbuh yang ditemukan dapat berupa auksin dan sitokinin. Jika konsentrasi auksin lebih besar daripada sitokinin maka kalus akan tumbuh dan apabila sebaliknya maka akan tumbuh tunas (Sudarmadji, 2003).

Naphthalene Acetic Acid (NAA) adalah salah satu jenis auksin sintetik yang memiliki berat molekul 186,21 dan rumus molekul C₁₂H₁₀O₂. *Naphthalene Acetic*

Acid (NAA) zat pengatur tumbuh yang mendorong pembentukan morfogenesis dan pembelahan sel. Respon pembentukan kalus pada eksplan tanaman tebu dengan perlakuan media MS + NAA 3 mg/L dapat menghasilkan persentase eksplan berkalus sebesar 10% (Gopitha *et al.*, 2010). Respon kultur embrio gandum *Triticum aestivum* cultivar yakar dengan perlakuan MS + NAA 1 mg/L dapat menghasilkan induksi kalus 48,33% dua minggu setelah inokulasi (Nasircilar *et al.*, 2006).

Kinetin (6 furfury amino purine) adalah salah satu jenis sitokinin sintetik. Kinetin memiliki respon terhadap morfogenesis, pengaturan pembelahan dan deferensiasi jaringan (Sriyanti dan Wijayani, 1994). Respon perlakuan media kultur antara NAA 0,4 mg/L + Kinetin 6 mg/L kultivar pisang mauli memberikan hasil yang tertinggi terhadap persentase hidup eksplan yaitu 87,5%. Sedangkan pemberian NAA 0,8 mg/L + Kinetin 9 mg/L kultivar pisang kepok memberikan saat pertumbuhan kalus yang tercepat yaitu 11 hari (Nisa dan Rodinah, 2005).

Benzil amino purine (BAP) adalah salah satu jenis sitokinin sintetik yang memiliki berat molekul 225,26 dan rumus molekul $C_{12}H_{11}N_5$. Respon morfogenik dari eksplan kotiledon *Citrullus colocynthis* 6 minggu setelah inokulasi dengan perlakuan MS + NAA 1 mg/L + BAP 1 mg/L menghasilkan kalus dengan frekuensi tumbuh 5% (Shasthree *et al.*, 2009). Konsentrasi BAP sebagai media regenerasi tunas 60 hari setelah inokulasi kalus menghasilkan persentase regenerasi tunas tertinggi 37% dengan perlakuan 3 mg/L BAP (Sherkar dan Chavan, 2014).

Zat pengatur tumbuh BAP adalah golongan sitokinin sintetik yang paling sering dipakai dalam media kultur. BAP adalah sitokinin sintetik yang aktif dan memiliki daya rangsang lebih lama karena tidak mudah dirombak oleh enzim tanaman (George & Sherrington, 1984). Struktur BAP mirip dengan Kinetin dan aktif dalam proliferasi dan pertumbuhan kalus (Noggle dan Fritz, 1983) sehingga BAP termasuk sitokinin yang aktif.

2.7 Putresin

Putresin adalah bagian dari senyawa poliamin. Poliamin adalah suatu senyawa derivat dari ammonia organik yang mana 1,2, atau 3 atom hidrogennya

digantikan oleh gugus alkil atau gugus aril. Poliamin biasanya ditemukan pada tanaman yang terletak pada dinding sel, mitokondria, kloroplas, dan vakuola. Pada nucleus dan nukleolus juga terdapat komponen poliamin (Niklas *et al.*, 1998). Pada beberapa jurnal juga mengatakan bahwa poliamin adalah suatu senyawa yang berperan penting sebagai regulator pertumbuhan tanaman. Ada pula yang menyebutkan bahwa poliamin dapat membantu meningkatkan embryogenesis pada kultur jaringan tanaman (Dewi *et al.*, 2004; Chiancone *et al.*, 2006; Hema and Murthy, 2008) terutama poliamin eksogen (penambahan dari luar tubuh tanaman).

Poliamin terdiri atas putresin, spermidine, dan spermin. Ketiga golongan poliamin tersebut memiliki peran penting dalam proses fisiologis, morfogenesis, diferensiasi dan inisiasi perbungaan, dan respon terhadap stress biotik-abiotik (Bouchereau *et al.*, 1999; Martin-Tanguy, 2001; Cohen, 1998; Górecka *et al.*, 2007; Szafrńska *et al.*, 2011). Poliamin terutama putresin dapat mencegah proses degradasi membran sitoplasma dan konsentrasi senyawa etilen secara berlebihan, sehingga bisa membantu penundaan pada proses penuaan (Tiburcio *et al.*, 1993). Putresin lebih efisien daripada spermidine atau spermin dalam peningkatan induksi kalus dan regenerasi tanaman hijau dalam kultur anthera tanaman padi Taipei 309 dengan konsentrasi terbaik yaitu $10^{-3}M$ (Dewi *et al.*, 2004).

Biosintesis poliamin (PA) memiliki peran penting dalam prekursor pembentukan senyawa putresin menjadi spermidine dan spermine yaitu S-adenosylmethionone (SAM). Disisi lain SAM adalah juga prekursor dalam pembentukan biosintesis etilen. Biosintesis etilen melalui pembentukan senyawa 1-aminocyclopropane-1-carboxylic (ACC) adalah dengan bantuan prekursor SAM. Menurut Bais dan Ravishankar (2002), dalam hal ini SAM adalah senyawa kunci untuk meningkatkan laju biosintesis poliamin yang bisa menurunkan laju biosintesis etilen. Menurut Dewi dan Purwoko (2008), cepatnya penuaan pada anthera yang dikultur secara *in vitro* adalah akibat dari penumpukan produksi senyawa etilen, sehingga kerja dari etilen dan poliamin khususnya putresin adalah antagonis, dimana laju etilen yang tinggi bisa dihambat oleh adanya senyawa poliamin dengan prekursor keduanya yang sama.

2.8 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang permasalahan dan tujuan penelitian, maka dapat diambil hipotesis bahwa pada kombinasi konsentrasi ZPT auksin lebih tinggi pada media induksi akan mendapatkan hasil kalus lebih dalam jumlah banyak dan pada kombinasi konsentrasi ZPT sitokinin lebih tinggi pada media regenerasi didapatkan kalus yang berkembang membentuk planlet.



BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat & Waktu Penelitian

Penelitian ini yang berjudul “Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) & Putresin Terhadap Daya Perbanyak dan Regenerasi Kalus Antera Padi Hitam” dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, CDAST Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2018 sampai selesai.

3.2 Alat & Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada saat penelitian berlangsung meliputi, pH meter, Stirer, Autoklaf, LAF (Laminar Air Flow), Inkubator 28°C, Rak Kultur Jaringan, Pipet & Tip, Gelas beaker, Erlenmeyer, Gelas Ukur, Pinset, Pinset L, Gunting, Bunsen, Cawan Petri (kaca), Cawan Petri (dispo), Spidol, Korek api.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada saat penelitian berlangsung meliputi, varietas padi hitam yang digunakan yaitu ada 5 varitas yaitu Hitam Melik (HM), Pari Ireng (PI), Hitam Bantul (HB), Hare Lahok (HL), Hitam Banjarnegara (HBj). Formulasi Media Induksi Kalus (MS, Maltosa, NAA, Kinetin, Glutamin, Putresin, Phytigel), Formulasi Media Regenerasi (N6, Maltosa, NAA, BAP), Kloroks, Aquades steril, Alkohol 70%, Alkohol 96%, Spiritus, Alumunium foil, Tissue, Kertas saring, Plastik wrap, Label.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian “Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh & Putresin Terhadap Daya Perbanyak dan Regenerasi Kalus Antera Padi Hitam” menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dua variabel yaitu kombinasi media dan 5 varietas padi hitam lokal. Rancangan penelitian ini ada 4 tahapan yaitu: 1) Perlakuan suhu dingin (*Cold pre-treatment*), 2) Induksi kalus, 3) Penambahan putresin pada media induksi, 4) Regenerasi kalus. Faktor-faktor di luar perlakuan (faktor lingkungan) pada unit percobaan sedapat mungkin dikondisikan serba sama (homogen).

Tabel 3.1 Waktu lama *Cold pre-treatment*

Suhu	Hari	Σ antera
4°C	0	50
	4	50
	8	50
	10	50
	12	50

Perlakuan suhu dingin ini dilakukan pada salah satu varietas yang memiliki umur (hari) waktu bunting atau waktu berbunga paling cepat, sehingga hasil optimasi bisa diterapkan pada varietas berikutnya. Varietas yang dilakukan optimasi yaitu Hitam Bantul (HB).

Tabel 3.2 Kombinasi Media Induksi Kalus

Kode perlakuan	NAA (mg/L)	Kinetin (mg/L)
T1	0.5	0.25
T2	1	0.25
T3	1.5	0.25
T4	2	0.25
T5	0.5	0.5
T6	1	0.5
T7	1.5	0.5
T8	2	0.5

Kombinasi media induksi kalus diterapkan untuk lima varietas padi hitam yaitu Hitam Melik (HM), Pari Ireng (PI), Hitam Bantul (HB), Hare Lahok (HL), Hitam Banjarnegara (HBj).

Tabel 3.3 Kombinasi Media Induksi Kalus Terbaik + Putresin

Kode perlakuan	NAA (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Putresin (μ M)
T8	2	0.5	0
T8	2	0.5	0,5
T8	2	0.5	1
T8	2	0.5	1,5
T8	2	0.5	2

Kombinasi media induksi kalus dengan penambahan putresin adalah media induksi kalus terbaik dengan acuan media induksi yang memiliki persentase muncul kalus paling banyak. Pada Tabel 3.3 dimisalkan perlakuan media induksi

kalus pada kombinasi T8 (2 mg/L NAA + 0,5 mg/L kinetin). Varietas yang digunakan memiliki umur (hari) waktu bunting atau waktu berbunga paling cepat, sehingga hasil optimasi bisa diterapkan pada varietas berikutnya yaitu Hitam Bantul (HB).

Tabel 3.4 Kombinasi Media Regenerasi Kalus

Kode perlakuan	NAA (mg/L)	BAP (mg/L)
T1	1	1
T2	1	2
T3	1	3
T4	1	4
T5	2	1
T6	2	2
T7	2	3
T8	2	4
T9	3	1
T10	3	2
T11	3	3
T12	3	4

Kombinasi media regenerasi kalus pada Tabel 3.4 adalah media dengan konsentrasi sitokinin lebih tinggi. Mengacu pada hipotesis bahwa media regenerasi dengan konsentrasi sitokinin tinggi bisa mempercepat proses diferensiasi kalus menjadi greentop. Jika ada kalus dari varietas tertentu yang tidak memberikan respon positif maka data ditulis *NA (Not Available)*.

3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1 Pembuatan Stok Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

3.4.1.1 Stok NAA (Naphtalene acetic acid)

Membuat stok NAA 1000 ppm yaitu menimbang serbuk NAA sebanyak 100 mg, dilarutkan dengan aquades sampai 100 ml dalam gelas beaker. Untuk melarutkan serbuk NAA maka perlu ditambah dengan KOH 1 N beberapa tetes. Kemudian dihomogenkan menggunakan magnetic stirer. Stok NAA 1000 ppm disimpan dilemari pendingin.

3.4.1.2 Stok Kinetin

Membuat stok Kinetin 1000 ppm yaitu menimbang serbuk Kinetin sebanyak 100 mg, kemudian dilarutkan dengan aquades sampai volume 100 ml dalam gelas beaker. Untuk melarutkan serbuk kinetin perlu ditambahkan HCl 1 N beberapa tetes. Larutan tersebut dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer. Stok disimpan dilemari pendingin.

3.4.1.3 Stok BAP (Benzyl amino purine)

Membuat stok BAP 1000 ppm yaitu menimbang serbuk BAP 100 mg, kemudian dilarutkan dengan aquades sampai volume 100 ml dan dimasukkan ke dalam gelas beaker. Untuk melarutkan serbuk BA maka ditambahkan HCl 1 N beberapa tetes. Agar larut sempurna maka dihomogenkan dengan menggunakan magnetic stirrer. Stok disimpan dilemari pendingin.

3.4.1.4 Stok Putresin (1 mM)

Putresin memiliki Berat Molekul (BM) = 88,15 g/mol dan Massa molekul relatif (Mr) = 161,1. Pembuatan larutan stok putrescin 1 M dilakukan dengan menggunakan rumus molaritas.

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{1.000}{mL}$$

M = Molaritas (M)
 g = gram (gr)
 Mr = Massa molekul relatif
 mL = Volume larutan (ml)

Larutan stok yang akan dibuat sebanyak 50 ml, sehingga untuk membuat larutan 1 M putresin sebanyak 50 ml dibutuhkan 8,055 gr putresin. Untuk membuat stok menjadi 1 mM maka dilakukan pengenceran dari 1 M putresin menggunakan rumus pengenceran.

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

M₁ = konsentrasi stok (M)
 M₂ = konsentrasi pengenceran (M)
 V₁ = volume stok (ml)
 V₂ = volume diencerkan (ml)

Larutan stok 1 M diambil sebanyak 0,01 ml lalu dilarutkan sampai volume 50 ml sehingga menjadi larutan putresin 1 mM. Stok larutan putrescin yang tersedia akan diambil dengan variasi (0; 5; 10; 15; 20) μM per 100 ml media.

3.4.2 Pembuatan Media

3.4.2.1 Media Induksi Kalus

Media kultur untuk induksi kalus menggunakan media Murashige & Skoog (MS), dibuat sebanyak 100 ml untuk 5 cawan petri untuk tiap pembuatan dan perlakuan. Formulasi media induksi kalus terdiri atas media Murashige & Skoog (MS) 4 gr/L, maltose 10 gr/L, NAA, kinetin, glutamin 0,5 gr/L, putresin 1 mM dan phytigel 2,5 gr/L. Pada media induksi kalus digunakan beberapa variasi konsentrasi zat pengatur tumbuh seperti pada Tabel 3.1. Seluruh formulasi masing-masing dimasukkan di dalam Erlenmeyer hingga homogen kecuali pytagel ditambahkan terakhir ketika media akan dipanaskan dengan autoklaf.

Media yang sudah homogen maka akan dilakukan pengukuran pH dengan kisaran 5,7. Dilakukan penambahan HCl bila larutan terlalu basa atau KOH bila terlalu asam. Kemudian phytigel ditambahkan dan sterilisasi menggunakan autoklaf. Setelah itu media dituang dan dibagi menjadi 20 ml per cawan petri dalam keadaan masih cair. Penuangan media dilakukan di dalam LAF agar tidak terkontaminasi. Terakhir dilakukan penutupan cawan setelah media dingin dan dilapisi dengan plastik silk pada bibir cawan agar rapat dan menghindari kontaminasi dan diberi label sesuai perlakuan.

3.4.2.2 Media Regenerasi

Media regenerasi yang digunakan sebanyak 100 ml untuk 5 cawan petri untuk tiap pembuatan dan perlakuan. Formulasi media regenerasi terdiri atas media N6 4 gr/L, maltosa 30 gr/L, NAA, BAP, glutamin 2,5 gr/L dan phytigel 2,5 gr/L. Pada media regenerasi digunakan konsentrasi zat pengatur tumbuh dengan beberapa variasi seperti pada Tabel 3.2. Seluruh formulasi masing-masing dimasukkan di dalam Erlenmeyer hingga homogen kecuali pytagel ditambahkan terakhir ketika media akan dipanaskan dengan autoklaf. Untuk langkah berikutnya sama dengan langkah pada pembuatan media induksi kalus, tetapi ukuran pH pada media regenerasi yaitu pH 5,8.

3.4.3 Persiapan Tanaman

Tanaman yang akan digunakan untuk penelitian yaitu tanaman Padi Hitam Varietas Lokal. Stok benihnya diperoleh dari BB Padi. Padi Hitam ditanam dan

dibudidayakan di Green House lantai 9 Gedung Laboratorium CDAST Universitas Jember. Tanaman padi yang sudah memasuki fase bunting, dipanen dan digunakan sebagai stok eksplan antera.

3.4.4 Sterilisasi Ruang, Alat, Bahan & Media

Sterilisasi Ruangan Kultur Jaringan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman CDAST Universitas Jember dengan menggunakan formalin, alcohol dan sinar UV. Sterilisasi alat menggunakan Autoklaf dan juga sinar UV di LAF. Sterilisasi bahan eksplan (antera) dengan menggunakan larutan kloroks 20%. Sterilisasi Media dengan menggunakan autoklaf.

3.5 Kultur Antera

3.5.1 Persiapan Antera

Tanaman padi yang bunting akan dipanen sebelum malainya keluar dari seludang. Kriteria padi yang bunting siap untuk dipanen yaitu ketika padi bunting memiliki jarak antara daun akhir (subtending leaf) dan daun bendera (flag leaf) sekitar 9-12 cm.

3.5.2 Optimasi Perlakuan suhu dingin (*Cold Pre-Treatment*)

Tangkai padi bunting dipanen sekitar siang sampai sore hari menggunakan gunting yang steril dan disemprot alkohol. Setelah itu (*panicles*) di bungkus dengan alumunium foil (sisakan sedikit bagian pangkal yang tidak dibungkus) dan direndam dalam botol selai berisi aquades. Kemudian beri label tanggal panen dan nama varietas padi, simpan di suhu 4°C selama interval 0; 4; 8; 10; 12 hari. Setelah memperoleh perlakuan suhu (*cold pre-treatment*) yang optimal untuk pertumbuhan kalus maka hasil optimasi lama perlakuan suhu dingin pada antera siap ditanam di media kultur.

3.5.3 Sterilisasi Eksplan (Antera)

Antera disterilisasikan di dalam LAF terlebih dahulu sebelum ditanam di media kultur. Hal ini penting dilakukan untuk meminimalisir kontaminasi baik dari bakteri atau jamur. Pertama seludang malai dibuka diluar LAF dan malai padi dimasukkan tanpa boleh tersentuh oleh tangan kecuali tangkai pangkalnya. Setelah itu malai disterilisasi dengan digojok larutan natrium hipoklorit (kloroks) 20%

dalam gelas beaker selama 15 menit. Bilas menggunakan aquades steril 6-8 kali hingga tidak tercium bau kloroks. Pada bilasan terakhir sisakan aquades steril sedikit untuk merendam malai dalam gelas beaker agar tidak kering, lalu malai padi siap diambil antenanya.

3.5.4 Induksi Kalus

Malai padi yang sudah steril diambil dengan pinset steril, spikelet dipotong dengan gunting steril dan disisakan 1/3 bagian dari pangkal. Bagian spikelet yang sudah terpotong diletakkan pada cawan petri kaca yang sudah diberi alas kertas saring terlebih dahulu. Kemudian ujung potongan spikelet dijepit dengan pinset dan di ketukkan di tepi cawan petri yang sudah berisi media induksi kalus. Hal ini dilakukan sampai antera terjatuh tepat diatas media. Satu cawan petri diperkirakan berisi ± 100 antera. Kemudian semua antera dalam cawan diinkubasi dalam kondisi gelap suhu $25 \pm 3^\circ \text{C}$.

Kultur antera tersebut diamati apakah ada kontaminasi baik jamur atau bakteri. Diperkirakan kultur akan berkalus sekitar 3-8 minggu setelah inokulasi. Dari proses awal muncul kalus dilakukan pengamatan 3 kali dengan rentang 7 hari untuk mengetahui ukuran kalus dan kecepatan tumbuh kalus. Setelah itu kalus yang muncul dan teramati diberi tanda dan dihitung sebagai data awal. Adapun kriteria pengamatan induksi kalus yaitu :

1. Panjang kalus (mm)
2. Kecepatan tumbuh kalus (mm/hari)
3. Persentase muncul kalus (%)
4. Foto / Deskripsi Visual

Rumus yang digunakan untuk mengukur kecepatan tumbuh kalus dengan interval 7 hari pengamatan sebanyak 3 kali pengamatan mulai dari hari ke 30; 37; 44 setelah penanaman antera pada media kultur yaitu :

$$\text{Kec. tumbuh kalus} = \frac{\text{rata - rata ukuran kalus (mm)}}{\text{rentang hari pengamatan (hari)}}$$

Sedangkan rumus yang digunakan untuk pengukur persentase antera berkalus yaitu:

$$\% \text{ kalus tumbuh} = \frac{\sum \text{kalus muncul}}{\sum \text{anther ditanam}} \times 100\%$$

3.5.5 Regenerasi Kalus

Kalus yang terbentuk dan memiliki struktur baik maka akan disubkultur ke media regenerasi sekitar setelah 5-10 minggu dengan respon kalus yang positif. Respon kalus yang positif ditandai dengan kalus yang terus tumbuh besar dan tidak terkena kontaminasi. Setelah kalus dari media induksi dipindah ke media regenerasi maka dilakukan inkubasi tempat terang di rak ruang kultur jaringan dengan suhu $23\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Setelah 2-3 minggu dari masa regenerasi maka dilakukan pengamatan kultur kalus. Adapun kriteria pengamatan kalus regenerasi yaitu :

1. Waktu / lama regenerasi (hari)
2. Persentase kalus greenspot & brown (%)
3. Persentase terbentuk planlet (%)
4. Persentase muncul akar (%)

Kalus dengan kriteria muncul greenspot ditandai dengan warna hijau karena adanya klorofil. Rumus untuk menghitung persentase kalus greenspot yaitu :

$$\% \text{ kalus greenspot} = \frac{\sum \text{kalus greenspot}}{\sum \text{kalus regenerasi}} \times 100\%$$

Selain kalus greenspot ada kalus yang mengalami proses pencoklatan disebut dengan kalus browning. Kriterianya kalus tersebut berwarna coklat hingga hitam. Persentase kalus browning bisa diukur menggunakan rumus :

$$\% \text{ kalus brown} = \frac{\sum \text{kalus brown}}{\sum \text{kalus regenerasi}} \times 100\%$$

Kalus dengan kriteria greenspot bisa berpotensi untuk munculnya planlet hijau. Persentase planlet hijau bisa dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ planlet} = \frac{\sum \text{green planlet}}{\sum \text{kalus regenerasi}} \times 100\%$$

Kalus yang tumbuh pada beberapa perlakuan memungkinkan ada respon pembentukan akar. Persentase pembentukan akar pada kalus dihitung menggunakan rumus :

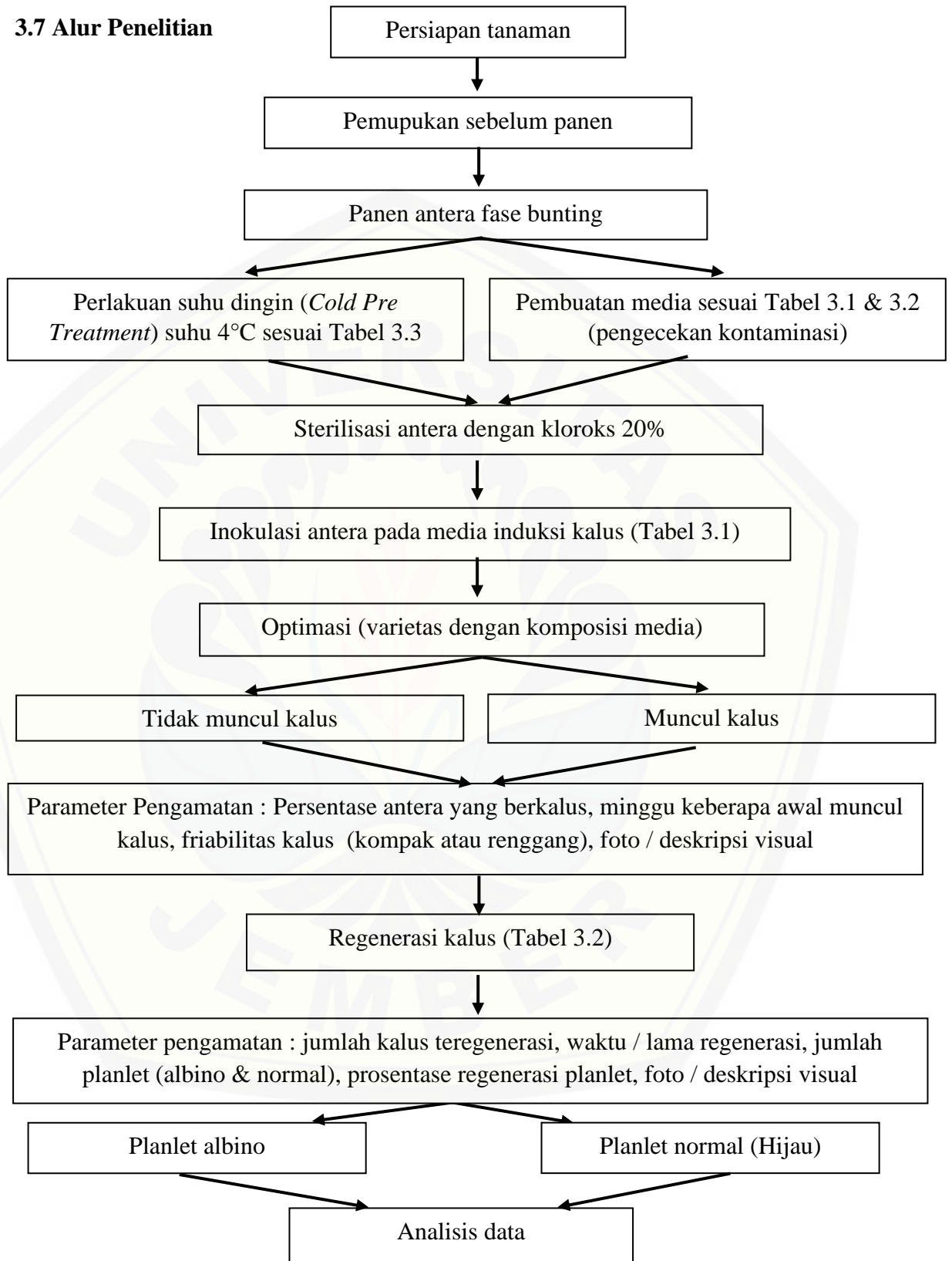
$$\% \text{ root} = \frac{\sum \text{kalus berakar}}{\sum \text{kalus regenerasi}} \times 100\%$$

3.6 Analisis Data

Data yang sudah diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA). Apabila terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan dilanjutkan dengan uji lanjut BNJ (Beda Nyata Jujur) dengan taraf nyata 5%. Tetapi bila tidak terdapat perbedaan maka data akan disajikan secara deskriptif.



3.7 Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Media induksi kalus terbaik yaitu 2 NAA + 0,5 Kinetin dengan persentase muncul kalus sebesar 26%. Optimasi penambahan putresin yang optimal yaitu 1,5-2 μM dengan persentase muncul kalus 20-27%. Kalus yang bisa diregenerasikan adalah kalus dari varietas Hitam Bantul (HB) dengan persentase pembentukan planlet 25% sebanyak 2 planlet hijau pada media kombinasi NAA 3 mg.L^{-1} + BAP 4 mg.L^{-1} .

5.2 Saran

Kombinasi media kultur anthera yang sudah didapatkan, dicoba ke varietas padi lainnya baik padi berpigmen atau tidak berpigmen. Kombinasi zat pengatur tumbuh bisa dicoba untuk auksin atau sitokinin jenis lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Antonietta, M. G., 2011, Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss. Org. cult.*, 104: 283–300.
- Bais, H.P. and G.A. Ravishankar. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications.
- Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. 2009. Beras hitam, Pangan Berkhasiat yang Belum Populer. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 31 (@2) : 9-10
- Bishnoi, U., R.K. Jain, J.S. Rohilla, v.k. Chowdury, K.R. Gupta, J.B. Chowdury. 2000. Anther culture or recalcitrant indica Basmati rice hybrids. *Euphytica* 114: 93-101.
- Bouchereau, A., A. Azis, F. Larher, and J. Martin-Tanguy. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci.* 140: 103-125.
- Chiancone B, Tassoni A, Bagni N, Germanà MA (2006). Effect of polyamines on in vitro anther culture of *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Plant Cell Tiss Org* 87: 145–153.
- Choi, S.P., Kang, M.Y., Koh, H.J., Nam, S.H., & Friedman, M. 2007. Antiallergic Activities of Pigmented Rice Bran Extracts in Cell Assays. *Journal of Food Science*. 72 (9) : 719-726
- Chung , G.S., and J.K. Sohn. 1996. Anther culture technology in rice. In Kannaiyan S (ed). Rice management Biotechnology. *Associated Publishing Co.* New Delhi, pp 1-9
- Cohen SS (1998). *A Guide to the Polyamine Metabolism*. New York, NY, USA: Oxford University Press.
- Dahleen, L.S. 1999. Donorplant Environment effects on regeneration from barley embryoderived callus. *Crop Sci* 39 : 682-685
- Dewi, I.S., I. Hanarida, and S. Rianawati. 1996. Anther culture and its application for rice improvement program in Indonesia. *Indon. Agric. Res. Dev.* J 18: 51-56

- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnor, and I.H. Somantri. 2004. Kultur antera padi pada beberapa formulasi media yang mengandung poliamin. *Journal Bioteknologi Pertanian* 9(1): 14-19
- Dewi, I.S., B.S. Purwoko, H. Aswidinnor, I.H. Somantri, dan M.A. Chozin. 2006. Regenerasi Tanaman pada Kultur Antera Beberapa Aksesori Padi Indica Toleran Aluminium. *AgroBiogen*, 2 (1): 30 – 35.
- Dewi IS, Purwoko BS. 2008. Role of polyamines in inhibition of ethylene biosynthesis and their effects on rice anther culture development. *Indones J Agric Sci* 9:60–67
- Dewi, I.S., dan B.S. Purwoko. 2012. Kultur Antera Untuk Percepatan Perakitan Varietas Padi di Indonesia. *Journal AgroBiogen* 8(2): 78-88
- Dunwell, J.M., 2010 Haploid in flowering plants : origins and exploitation . *Plant Biotechnology Journal* 8 : 377-424
- Finnie SJ, Powell W, Dyer AF. 19989. The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Breeding* 103 :110-118
- George, E.F., dan P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetics Limited. England
- Germana MA. 2006. Double Haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tiss Org Cult*. 86: 131-146
- Gopitha, K., A. L Bhavani and J. Senthilmanickam. 2010. Effect of the different auxins and cytokinins in callus induction, shoot, root regeneration in sugarcane. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. Vol. 1/Issue-3/Jul-Sep.2010.
- Górecka K, Cvikrova M, Kowalska U, Eder J, Szafrńska K, Górecki R, Janas KM (2007). The impact of Cu treatment on phenolic and polyamine levels in plant material regenerated from embryos obtained in anther culture of carrot. *Plant Physiol Biochem* 45: 54–61.
- Gueye, T. and Nidr, K. 2010. In vitro production of doubled haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the haploid

- development of new breeding material. *Scientific Research and Essays* 5(7): 709-713.
- Hema BP, Murthy HN (2008). Improvement of in vitro androgenesis in niger using amino acids and polyamines. *Biol Plant* 52: 121–125.
- Ichikawa, H., Ichiyanagi, T., Xu, B., Yoshii, Y., Nakajima, M., & Konishi, T., 2001. Antioxidant Activity of Anthocyanin Extract From Purple Black Rice. *Journal of Medicinal Food*. 4 (4) : 211-218
- Jahne, A. and Lorz H. 1995. Cereal microspore culture. *Plant Sci*. 109 : 1-12
- Jang, Park, Kim, Lee, Hwang, Park, Park, dan Kwon. 2012. Black Rice (*Oryza sativa* L.) . Extract Attenuates Hepatic Steatosis in C57BL/6 J Mice Fide a High-Fat Diet via Fatty Acid Oxidation. *Nutrition & Metabolism*. 9 (27) : 1-11.
- Kaushal, L., S.M. Balachandran, K. Ulaganathan, and Vinay Shenoy. 2014. Effect of Culture Media on Improving Anther Culture Response of Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 3(1): 218 – 224.
- Khatun R, Shahinul Islam SM, Ara I, Tuteja T, Bari MA. 2012. Effect of cold treatment and different media culture response in rice (*O sativa* L.) in Bangladesh. *Indian Journal of Biotechnology* 11; 458-463.
- Kikuchi A., Sanuki N., Higashi K., Koshiha T., Kamada H. 2006. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* 223: 637-645.
- Kiviharju E, Pehu e. 1998. The effect cold and heat pretreatment on anther culture response of *Avena sativa* and *A. Sterilis*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 54: 97-104
- Kristamtini, Setyorini Widyayanti, Sutarno, dan Sudarmaji. 2012. Genetic Diversity of Five Local Black Rice Cultivars from Yogyakarta Based on Morphological Properties. Proceedings of the National Seminar on Agricultural Genetic Resources. Center for Agricultural Technology Assessment (BPTP) Yogyakarta

- Kumar, A., T. Altabella, M.A. Taylor, and A.F. Tiburcio. 1997. Recent advances in polyamine research. *Trends in Plant Sci.* 2:124-130.
- Kushwana, U.K.S. 2016. Black Rice. Springer International Publishing Switzerland.
- Last DJ, Brettell RIS. 1990. Embryo yield in wheat antherculture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Report.* 9:14-16
- Lestari, A.P. 2009. Evaluation of the quality of rice 18 rice lines resulting from anther culture. In Setyono, A., Nugraha, S.D. Indrasari, and S.Y. Agus (eds). Rice Technology Innovation Anticipating Global Climate Change Supports Food Security. National 2008 Rice Seminar Prosidig. *Center for Rice Research.* P. 1449-1455.
- Martin-Tanguy J (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new ap- proaches). *Plant Growth Regul* 34:135–148
- Meifang, L. 1992. Anther culture breeding of rice of at the CAAS. In : K. Zeng and T: Murashige (eds) 75-85. *Anther culture for rice breeders.* Hangzou, China.
- Narwidina, P. 2009. Development of Isotonic Drinks of Black Rice Anthocyanin (*Oryza sativa L.indica*) and Its Effects on Fitness and Antioxidant Activity in Humans Post Physical Stress: A Case Control Study. Postgraduate Program of the Faculty of Agricultural Technology. Gadjah Mada University.
- Nasircilar, A.G., K. Turgut., and K. Fiskin. 2006. Callus Induction and Plant Regeneration from Mature Embryos of Different Wheat Genotypes. *Pak. J. Bot.*, 38(2): 637-645
- Niklas A, Butowt R, Jażdżewska E, Majewska-Sawka A (1998). Polyamines in plant cell: synthesis, the mechanisms of action and functions. *Advan Cel Biol* 25: 33–49.
- Nisa Chatimatun dan Rodinah. 2005. Kultur Jaringan Beberapa Kultivar Buah Pisang (*Musa paradisiaca L.*) dengan Pemberian Campuran NAA Dan Kinetin. *Bioscientiae.* Volume 2, Nomor 2, Juli 2005, Halaman 23-36.

- Noggle, G. R., dan G. J. Fritz. 1983. *Introductory Plant Physiology: Second Edition*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- Nurhasanah, Ananda N. Pratama, Widi Sunaryo. 2016. Anther culture of local upland rice varieties from East Kalimantan : effect of panicle cold pre-treatment and putrescine enriched medium. *Biodiversitas*. Volume 17, Number 1, April 2016 Pages: 148-153
- Pengkumsri, Chaiyasut, Saenjum, Sirilun, Peerajan, Suwannalert, Sirisatha, dan Sivamaruthi. 2015. Physicochemical and Antioxidative Properties of Black, Brown, and Red Rice Varieties of Northern Thailand. *Food Science and Technology*. 35 (2) : 331-338.
- Reinert, J. Bajaj Y.P.S. 1977 Anther culture : haploid production and its significance, In : Reinert J, Bajaj Y.P.S. (eds) *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture*. Springer, Berlin, pp 251-267.
- Sa'adah , I. R., Supriyanata, and Subejo. 2013. Keragaman Warna Gabah dan Warna Beras Varietas Lokal Padi Beras Hitam (*Oriza sativa* L.) yang Dibudidayakan Oleh Petani Kabupaten Sleman, Bantul, dan Magelang. *Vegetalika*. 2 (3) : 13-20.
- Sandra, E. 2012. *Cara Mudah Memahami dan Menguasai Kultur Jaringan Skala Rumah Tangga*. Bogor: IPB Press.
- Sasmita, P. 2007. Application of Anther Culture Techniques on Rice Plant Breeding. *Appreciation of Rice Research Results*
- Sen C, Singh R P, Singh M K, Singh H B. 2011. Effect of cold pre-treatment on anther culture of boro rice hybrids. *Int J Plant Rep Biol*, 3; 69-73
- Shastree, T., Madhavi, S., Mallaiah, B. 2009. Regeneration of plantlets of *Erythrina variegata* L. By organogenesis. *Res. J. Biotech*. 4 (3), 30-37.
- Sherkar H.D dan Chavan A.M. 2014. Effect of 2,4-D; BAP and TDZ on Callus Induction and Shoot regeneration in Potato. *Science Research Reporter*, 4(1): 101-105, (April-2014) ISSN: 2249-7846.

- Shukla, R., E.P. Koshy, and M.D. Ojha. 2018. Best Plant Harmon Combination for *In Vitro* Callus Initiation, Organogenesis and Regeneration Of Rice cv. Swarna Sub1. *Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2): 1890-1894.
- Silva T D, Ratnayake W J. 2009. Anther culture potencial of indica rice varieties, Kurulu Thuda and BG250. *Trop Agric Res Ext*, 12 (2): 53-56
- Sompong, R., Siebenhandl, E. S., Linsberger, M. G., dan Berghofer, E. 2011. Physicochemical and Antioxidative Properties od Red and Black Rice Varieties from Thailand, China, and Sri Lanka. *Food Chemistry*. 124 91) : 132-140.
- Sriyanti, D.P. dan A.Wijayani. 1994. Teknik Kultur Jaringan. Yayasan Kansius. Yogyakarta. Hal. 18, 54, 57, 63, 67, 69, 82-83.
- Sudarmaji. 2003. Pengaruh Benzyl Amino Purine pada Pertumbuhan Kalus Kapas secara In Vitro. *Buletin Teknik Pertanian* 8 (1): 8-10.
- Szafrańska K, Cvikrova M, Kowalska U, Górecka K, Górecki R, Martinova O, Janas KM (2011). Influence of copper ions on growth, lipid peroxidation, and proline and polyamines content in carrot rosettes obtained from anther culture. *Acta Physiol Plant* 33: 851–859.
- Tiainen, T. 1996. Influence of ethylene in microspore embryogenesis. In S.M Jain, S.K Sopory, R.E Veilleux (eds.). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Vol. I. *Fundamental Aspects and Methods*. Kluwer Acad. Publ. Netherlands. p. 177-187.
- Tiburcio AF, Campos JL, Figueras X, Besford RT (1993). Recent advances in the understanding of polyamine functions during plant development. *Plant Growth Reg* 12: 331–340.
- Touraev A, Indrianto A, Wratschko I, Vicente O, Heberle-Bors E. 1996. Efficient microspore embryogenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) induced by starvation at high temperature. *Sexual Plant Reproduction* 9: 209-215
- Vennapusa, A.R., R.S. Vemanna, Rajashekar R.B.H., K.C. Babitha, K. Kiranmai, A. Nareshkumar, and C. Sudhakar. 2015. An Efficient Callus Induction and Regeneration Protocol for a Drought Tolerant Rice *Indica* Genotype AC39020. *Plant Sciences*, 3(5): 248 – 254.

- Wattimena, G.A. 1988. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman PAU Bioteknologi IPB. Bogor. 145 hlm.
- Wiendi N.M.A., G.A. Wattimena. dan L.V. Gunawan. 1991. Perbanyakan Tanaman. Bioteknologi Tanaman I. PAU IPB. Bogor.
- Xie JH, Gao M, Cai Q, Sheng X, Shen Y, Liang Z. 1995 . Improved isolated microspore culture efficiency in medium with maltose and optimized growth regulator combination in japonica rice (*Oryza sativa*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42 : 245-250
- Xie, J.H., M.W. Gao, Z.Q. Liang, Q.Y. Shu, X.Y. Cheng, Q.Z. Xue. 1997. The effect of cool-pretreatment on the isolated microspore culture and the free amino acid change of anthers in Japonica Rice (*Oriza sativa* L.). *J. Plant Physiol.* 151 : 79-82.
- Zapata-Arias, F.J., L.B. Torrizo, and A. Ando. 2004. Current developments in plant biotechnology for genetic improvement : the case of rice (*Oriza sativa* L.) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11 : 393-399.
- Zulkarnain, H. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman Solusi Perbanyakan Tanaman Budidaya*. Jakarta: PT. Bumi Aksara.

LAMPIRAN DAN DOKUMENTASI

A. LIMA VARIETAS PADI HITAM

Tabel 1. Varietas Hitam Melik (HM)

NAA	Kin	30 hsk	37 hsk	44 hsk	rata2	kec.tumb
0,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,25	0,488	0,779	1,07	0,7790	0,1113
0,5	0,25	0,463	0,691	1,050	0,7347	0,1050
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,338	0,519	0,854	0,5703	0,0815
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,490	0,654	0,880	0,6747	0,0964
1,5	0,25	0,601	0,781	0,971	0,7843	0,1120
2	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,25	0,441	0,641	1,22	0,7673	0,1096
2	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,5	0,000	0,000	0,399	0,1330	0,0190
0,5	0,5	0,414	0,796	1,33	0,8467	0,1210
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,643	0,896	1,12	0,8863	0,1266
1,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,5	0,583	1,24	1,32	1,0477	0,1497
1,5	0,5	0,311	0,451	0,479	0,4137	0,0591
2	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,5	0,29	0,618	0,748	0,5520	0,0789
2	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000

Tabel 2. Varietas Pari Ireng (PI)

NAA	Kin	30 hsk	37 hsk	44 hsk	rata2	kec.tumb
0,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,25	0,466	0,723	0,965	0,7180	0,1026
0,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,641	0,739	0,767	0,7157	0,1022
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,576	0,756	0,869	0,7337	0,1048

2	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,25	0,658	0,98	1,51	1,0493	0,1499
2	0,25	0,000	0,000	0,758	0,2527	0,0361
0,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,5	0,000	0,000	0,317	0,1057	0,0151
0,5	0,5	0,418	0,963	1,68	1,0203	0,1458
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,596	0,888	1,53	1,0047	0,1435
1,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,5	0,606	0,885	1,43	0,9737	0,1391
1,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,5	0,655	0,825	0,916	0,7987	0,1141
2	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000

Tabel 3. Varietas Hitam Bantul (HB)

NAA	Kin	30 hsk	37 hsk	44 hsk	rata2	kec. Tumb
0,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,25	0,279	0,408	0,599	0,4287	0,0612
0,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,321	0,392	0,577	0,4300	0,0614
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,313	0,433	0,633	0,4597	0,0657
2	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,25	0,375	0,499	0,589	0,4877	0,0697
2	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,5	0,376	0,421	0,575	0,4573	0,0653
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,31	0,421	0,677	0,4693	0,0670
1,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,5	0,323	0,377	0,553	0,4177	0,0597
1,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,5	0,371	0,406	0,605	0,4607	0,0658

2 0,5 0,000 0,000 0,000 0,0000 0,0000

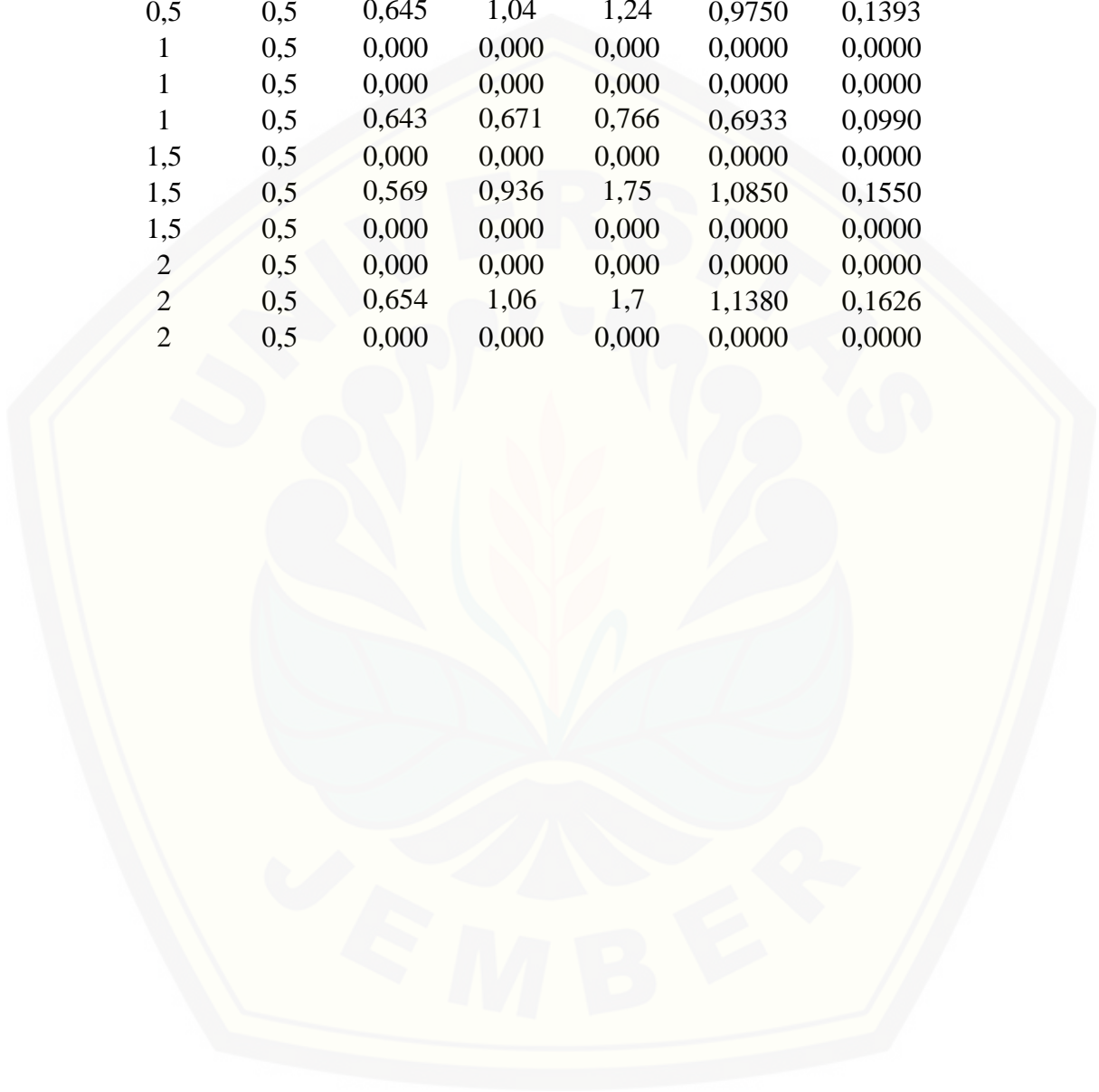
Tabel 4. Varietas Hare Lahok (HL)

NAA	Kin	30 hsk	37 hsk	44 hsk	rata2	kec.tumb
0,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,25	0,527	0,664	0,874	0,6883	0,0983
0,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,439	0,598	0,715	0,5840	0,0834
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,402	0,589	0,751	0,5807	0,0830
2	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,25	0,535	0,701	0,952	0,7293	0,1042
2	0,25	0,408	0,566	0,595	0,5230	0,0747
0,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,5	0,337	0,381	0,419	0,3790	0,0541
0,5	0,5	0,558	0,574	0,646	0,5927	0,0847
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,473	0,484	0,515	0,4907	0,0701
1	0,5	0,535	0,58	0,721	0,6120	0,0874
1,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,5	0,41	0,444	0,679	0,5110	0,0730
1,5	0,5	0,380	0,434	0,578	0,4640	0,0663
2	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,5	0,557	0,66	0,856	0,6910	0,0987
2	0,5	0,316	0,436	0,590	0,4473	0,0639

Tabel 5. Varietas Hitam Banjarnegara

NAA	Kin	30 hsk	37 hsk	44 hsk	rata2	kec.tumb
0,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,25	0,345	0,664	0,815	0,6080	0,0869
0,5	0,25	0,000	0,000	0,503	0,1677	0,0240
1	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,25	0,000	0,000	0,332	0,1107	0,0158
1	0,25	0,548	0,66	0,944	0,7173	0,1025
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,25	0,501	0,748	1,02	0,7563	0,1080

2	0,25	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,25	0,699	0,994	1,67	1,1210	0,1601
2	0,25	0,315	0,395	0,906	0,5387	0,0770
0,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
0,5	0,5	0,298	0,740	1,210	0,7493	0,1070
0,5	0,5	0,645	1,04	1,24	0,9750	0,1393
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1	0,5	0,643	0,671	0,766	0,6933	0,0990
1,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
1,5	0,5	0,569	0,936	1,75	1,0850	0,1550
1,5	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000
2	0,5	0,654	1,06	1,7	1,1380	0,1626
2	0,5	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,0000



B. PENANAMAN PADI



C. PERAWATAN PADI



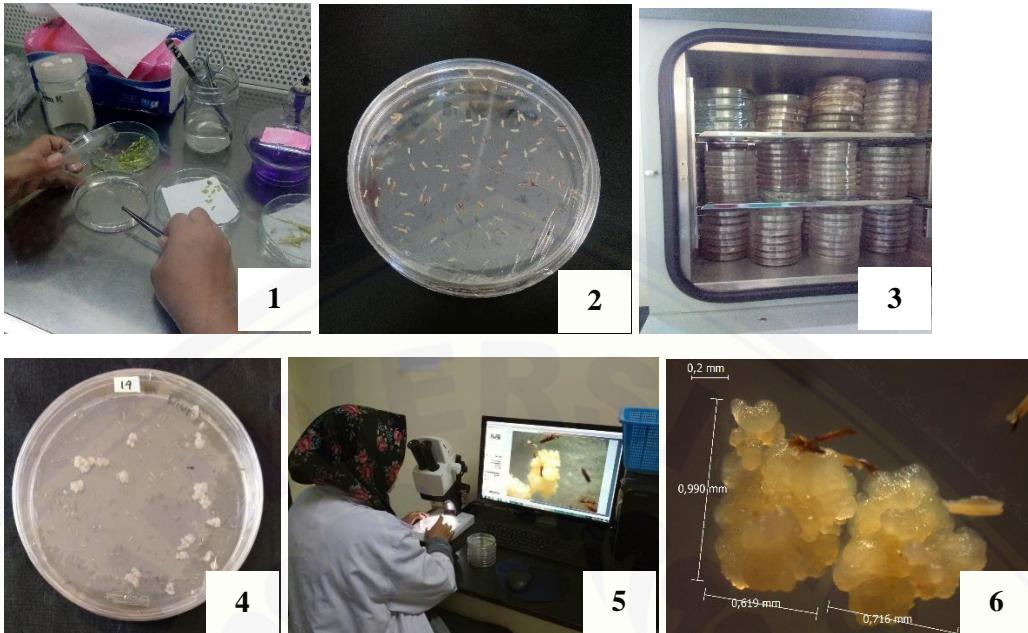
D. PANEN EKSPLAN (SUMBER POLEN) & COLD PRE-TREATMENT



E. PEMBUATAN MEDIA DAN STERILISASI



F. INDUKSI KALUS ANTERA



G. REGENERASI KALUS ANTERA

