

Peningkatan Efisiensi Regenerasi Melalui Optimasi Media Induksi Kalus dengan 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid pada Padi Indica (*Oryza sativa* L. var. Ciherang)

*Enhancement of Regeneration Efficiency through Callus Induction Media Using 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in Indica Rice (*Oryza sativa* L. var. Ciherang)*

Kunti Anis Azizah*, Didik Pudji Restanto**, Bambang Sugiharto*)

*Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

**Fakultas Pertanian, Universitas Jember

*)E-mail : sugiharto.fmipa@unej.ac.id

ABSTRACT

Indica rice variety Ciherang is the most planted variety in Indonesia, but the micropropagation technique is restricted because it is known has low regeneration frequency and included as recalcitrant cultivar for tissue culture and transformation activities. One of solution to resolve that problem is developing a technique of somatic embryogenesis in callus of ciherang rice cultivar. The aims of study were to determine medium composition for inducing embryogenic callus in Ciherang rice and to know the effectivity of rice regeneration using callus as explant. The methods were included induction of embryogenic callus in callus induction media (CIM) containing MS basal, Proline 600 mg/l, Casein Hidrolisat 300 mg/l, phytigel 2,5 g/l, BAP 0.25 mg/l, sukrosa 30 %, and 2,4-D in different concentration, from 2,4-D 0 mg/l as control (CIM 1), 2,4-D 2 mg/l (CIM 2), 2,4-D 3 mg/l (CIM 3), and 2,4-D 4 mg/l (CIM 4). It then be continued to regenerate the calli in RM 1 medium containing MS basal, NAA 0,2 mg/l, Kinetin 2 mg/l, Agarose 10 g/l, and sukrosa 30 %, pH 5,8 for six days in dark and RM2 medium containing MS basal, NAA 0,2 mg/l, Kinetin 2 mg/l, Agarose 8 g/l, sukrosa 30 %, pH 5,8 in light room. Results showed CIM 4 medium using 2,4-D 4 mg/l gave optimum result in calli induction with procentage 57,63% and CIM 3 using 2,4-D 3 mg/l gave optimum result in embryonic calli induction with procentage 53,63%. Result of embryonic calli gave regeneration frequency procentage is 9,6%. The total planlet obtained after five weeks old in regeneration medum were 11 planlets ready for aclimatization.

Keywords: somatic embryo, indica rice (*Oryza sativa* L. var. ciherang), callus

PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.) varietas Ciherang merupakan padi indica hasil persilangan antara varietas IR64 dengan varietas IR18349-53-1-3-1-3/3 (Suprihatno *et al.*, 2009). Padi indica varietas Ciherang banyak dibudidayakan di Indonesia, tetapi masih sulit digunakan untuk tujuan mikropropagasi karena sebagian besar varietas padi indica dikenal mempunyai daya regenerasi rendah dan merupakan varietas rekalsitran untuk kegiatan kultur jaringan dan transformasi genetik. Varietas rekalsitran dikenal karena rendahnya kemampuan tanaman dalam produksi dan regenerasi kalus (Khatun *et al.*, 2003). Kultur jaringan melalui embriogenesis somatik menggunakan eksplan kalus merupakan salah satu teknik yang sering digunakan dan merupakan langkah kunci dalam bioteknologi padi (Meneses *et al.*,

2005). Embriogenesis somatik adalah proses perkembangan sel somatik membentuk sel embriogenik melalui tahap-tahap perubahan morfologi tanpa proses peleburan sel gamet (Quiroz-Figuera *et al.*, 2006). Petrasek *et al.* (2002) melaporkan bahwa pembelahan dan pertumbuhan sel tanaman secara *in vitro* membutuhkan sumber auksin eksternal yang sangat penting dalam regulasi fase standar siklus pertumbuhan. Jenis auksin yang sering digunakan dalam media kultur adalah auksin sintesis 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D). Libin *et al.* (2012) melaporkan bahwa penggunaan 2,4-D 2 mg/l dalam media MS sangat efektif dalam menginduksi kalus embriogenik pada padi indica varietas Biris, Mondal *et al.* (2011) melaporkan penggunaan 2,4-D 4 mg/l dalam media MS menghasilkan induksi kalus embriogenik maksimum pada padi indica varietas Swarna. Sahoo *et al.*

(2011) memaparkan bahwa penggunaan 2,4-D sebanyak 3 mg/l memberikan hasil maksimal dalam induksi kalus embriogenik pada empat varietas indica, salah satunya adalah varietas IR64. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa proliferasi kalus embriogenik dan kemampuan regenerasi ditentukan oleh metode optimasi serta formulasi media induksi kalus dan regenerasi yang tepat.

Kombinasi antara 2,4-D dan BAP pada media induksi kalus berperan dalam induksi sifat-sifat embriogenesis somatik, misal struktur bipolar melalui regulasi arah morfogenesis dan menginduksi pertumbuhan kalus melalui proliferasi (Haensch, 2007; George *et al.*, 2008).

Penggunaan kasein hidrolisat dan prolin sebagai penyedia asam amino sangat berperan dalam mendukung kerja 2,4-D dalam menunjang proses inisiasi dan proliferasi kalus embriogenik, sekaligus mempertahankan sifat embriogenik kalus (Zhang *et al.*, 1996; Kishor *et al.*, 1999). Kasein hidrolisat merupakan jenis asam amino yang digunakan sebagai sumber nitrogen organik yang lebih cepat diasimilasi oleh tanaman daripada nitrogen (Saad dan Ahmed, 2012). Prolin dikenal sebagai osmolit *inert* yang dapat melindungi struktur subseuler dan makromolekul pada kondisi tekanan osmotik (Shubashini dan Reddy, 1991; Szabados dan Arnould, 2009).

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah untuk menentukan komposisi media induksi kalus embriogenik somatik pada padi (*Oryza sativa* L. var. Ciherang) dan untuk mengetahui efektivitas regenerasi padi dengan eksplan kalus pada padi Indica.

Penelitian tentang induksi embriogenesis somatik ini merupakan langkah awal untuk pengembangan teknik bioteknologi padi indica di Indonesia. Hasil yang didapat diharapkan dapat menjadi acuan teknis dalam melakukan transformasi genetik padi indica di Indonesia yang dapat memberikan kontribusi penting dalam peningkatan produktivitas padi nasional.

METODE

Penelitian ini menggunakan biji padi indica (*Oryza sativa* L. var. Ciherang). Jenis penelitian eksperimen dengan dua tahapan yaitu induksi kalus embriogenik menggunakan media dengan penggunaan 2,4-D pada konsentrasi berbeda, dimulai dari 0 mg/l sebagai perlakuan pertama sekaligus kontrol (CIM 1), 2,4-D 2 mg/l (CIM 2), 2,4-D 3 mg/l (CIM 3), dan 2,4-D 4 mg/l (CIM 4); dan regenerasi kalus embriogenik pada media regenerasi (RM) yang mengandung MS

basal, NAA 0,2 mg/l, Kinetin 2 mg/l, Agarose 10-8 g/l, dan sukrosa 30 %, pH 5,8. Metode tersebut mengacu pada penelitian yang telah dilakukan Sahoo *et al.*, (2011) dengan beberapa modifikasi diantaranya penggunaan waktu inkubasi saat induksi kalus embriogenik selama 21 hari tanpa subkultur dan pemindahan kalus RM1 ke RM2 tanpa proses subkultur.

Sterilisasi Benih

Biji padi (*Oryza sativa* var. Ciherang) yang telah dikupas disterilisasi dalam etanol 70% selama 5 menit, kemudian digojok dalam larutan NaClO 1% selama 10 menit. Biji padi kemudian dibilas dengan akuades steril sebanyak empat kali, kemudian dikeringkan dengan kertas filter steril selama dua jam. Biji diletakkan ke dalam media pengkalusan CIM 1, CIM 2, CIM 3, dan CIM 4. Digunakan empat cawan petri tiap perlakuan sebagai ulangan dan biji yang ditanam tiap cawan petri adalah sebanyak 18 biji.

Induksi Kalus Embriogenik

Biji ditumbuhkan di tempat gelap selama 21 hari dan suhu ruang kultur harus tetap terjaga pada kisaran 28° C. Media CIM yang digunakan memiliki pH 5,8 dan mengandung MS basal, Prolin 600 mg/l, Casein Hidrolisat 300 mg/l, phytigel 2,5 g/l, BAP 0.25 mg/l, sukrosa 30 %, dan 2,4 D dengan konsentrasi berbeda dimulai dari 0 mg/l sebagai perlakuan pertama sekaligus kontrol (CIM 1), 2,4-D 2 mg/l digunakan pada media CIM 2, 2,4-D 3 mg/l sebagai media perlakuan 3 (CIM 3), dan 2,4-D 4 mg/l sebagai media perlakuan 4 (CIM 4). Dihitung prosentase frekuensi induksi kalus total tiap perlakuan dan kalus embriogenik dicirikan dengan morfologi berwarna putih kekuningan, remah, dan memiliki tekstur kering.

Regenerasi Kalus Embriogenik

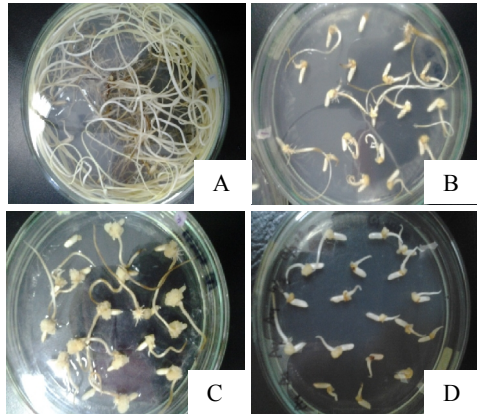
Kalus non-embriogenik (bertekstur basah, padat, dan berwarna kuning) dibuang, sementara kalus embriogenik dipotong dari biji dan dipindahkan pada media regenerasi 1 (RM 1) kemudian disimpan dalam ruang gelap dengan suhu 27 ± 1° C selama tujuh hari. Kalus yang telah mengalami proliferasi, dipindahkan ke tempat terang selama seminggu, kemudian dipindahkan pada media regenerasi 2 (RM 2) dan disimpan dalam tempat terang (16 jam terang, 8 jam gelap) dengan suhu 27 ± 1° C untuk disubkultur tiap tiga minggu sekali. Media RM1 yang digunakan mengandung MS basal, NAA 0,2 mg/l, Kinetin 2 mg/l, Agarose 10 g/l, dan sukrosa 30 %, pH 5,8; sementara media RM2 mengandung MS basal, NAA 0,2 mg/l, Kinetin 2 mg/l, Agarose 8 g/l, sukrosa 30 %, pH 5,8.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus Embriogenik

Keberadaan 2,4-D berpengaruh terhadap kemunculan kalus pada biji. Hasil penelitian menunjukkan bahwa CIM 1 tanpa penambahan

2,4-D, menunjukkan hasil konsisten berupa tidak terbentuknya kalus, melainkan terjadi organogenesis langsung membentuk tunas dan akar (Gambar. 1). Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan 2,4-D dapat menghambat morfogenesis pada biji tanaman.

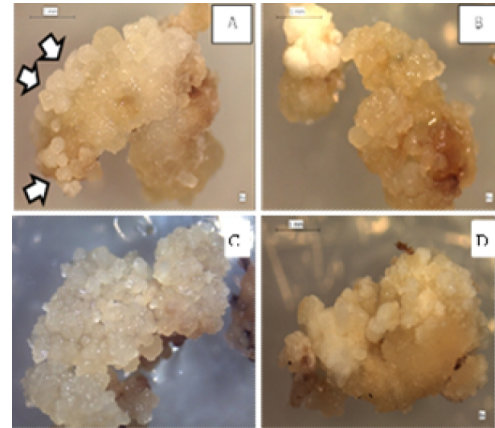


Gambar 1. Kondisi kalus umur 21 HST pada perlakuan: A) CIM 1, B) CIM 2, C) CIM 3, dan D) CIM 4

Media CIM 2 mulai menampakkan adanya pertumbuhan kalus dan peristiwa morfogenesis tunas dan akar direduksi, akan tetapi, kemunculan kalus embriogenik masih belum menampakkan hasil yang optimal.

Media CIM 3 dengan menggunakan 2,4-D 3 mg/l menghasilkan kalus embriogenik paling optimal dibandingkan media CIM yang lainnya. Pertumbuhan kalus yang dicapai pada media CIM 3 menunjukkan kalus embriogenik dalam jumlah lebih dari 50% dari total kalus yang tumbuh. Media CIM 4 menggunakan 2,4-D 4 mg/l memberikan hasil optimum untuk menginduksi kalus terbanyak dengan prosentase 57,63% (gambar 1). Akan tetapi, media CIM 4 justru memberikan prosentase induksi kalus embriogenik terendah sebesar 14,8%. Penurunan prosentase kalus embriogenik ditunjukkan dengan meningkatnya jumlah kalus yang mengalami nekrotik (Gambar 1D).

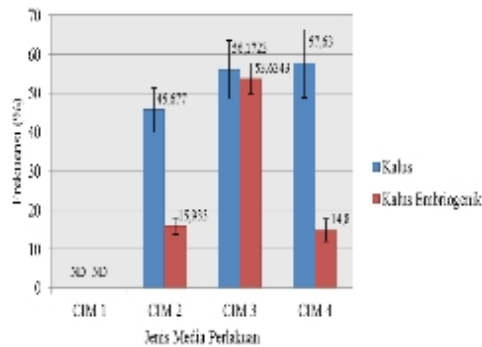
Sebagian besar kalus dari biji yang diinkubasi di tempat gelap selama 21 hari menunjukkan ciri-ciri embriogenik.



Gambar 2. Kondisi kalus: A dan C) kalus embriogenik, B dan D) kalus non-embriogenik.

Kalus embriogenik ditetapkan berdasarkan kondisi morfologi secara mikroskopis dengan ciri berwarna putih kekuningan (*creamy white*), remah (*friable*), dan bertekstur kering. kalus embriogenik dapat dilihat pada gambar 2A dan 2C.

Pertumbuhan kalus umur 21 HST ditentukan berdasarkan perhitungan perbandingan antara total kalus yang tumbuh dengan total benih. Prosentase kemunculan kalus embriogenik yang dapat diregenerasikan dapat diperoleh berdasarkan perhitungan perbandingan antara total kalus embriogenik dengan total kalus yang tumbuh. Grafik (gambar 3) menunjukkan pola spesifik pada pertumbuhan kalus. Media CIM 1 tanpa penambahan 2,4-D menunjukkan bahwa tidak ada pertumbuhan kalus tetapi terjadi proses morfogenesis pada biji menjadi tunas dan akar. Ketiadaan 2,4-D menampakkan stimulus pada biji untuk melakukan perkecambahan secara normal. Penambahan 2,4-D sebanyak 1 mg/l memberikan hasil pertumbuhan kalus sebesar 45,68%.



Gambar 3. Grafik perbandingan frekuensi induksi kalus dan kalus embriogenik. Tanda ND (*Not Detected*) menunjukkan bahwa pada media CIM 1 tidak ada kalus dan kalus embriogenik yang terinduksi.

Pertumbuhan kalus akan terus meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi 2,4-D dalam media. Hal ini dapat ditunjukkan prosentase pertumbuhan kalus tertinggi pada media CIM4 yang mengandung 2,4-D 4 mg/l. Hal ini mengindikasikan bahwa keberadaan 2,4D dapat menghambat morfogenesis pada perkecambahan biji. Gaj (2004) memaparkan bahwa keberadaan 2,4-D dalam kultur merupakan agen pemicu stres bagi tanaman. Ketika tanaman terpapar stres, maka tanaman akan memberikan respon stres dan sistem dalam jaringan tanaman akan melakukan *reprogramming* diferensiasi sel melalui aktivitas metilasi DNA menuju program dediferensiasi. Program dediferensiasi tersebut yang akan mengawal pertumbuhan biji dengan mempertahankan fase mitotik.

Hasil pertumbuhan kalus embriogenik menampilkan pola parabola. Peningkatan prosentase kalus embriogenik diawali dari konsentrasi 2,4-D 2 mg/l dan 3mg/l. Frekuensi kemunculan kalus sebesar 56,17% pada media CIM 3 yang paling optimal dalam menginduksi kalus embriogenik. Hal tersebut menunjukkan hasil yang serupa jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan Purnamaningsih (2006) yaitu sebesar 55,0%. Dari 56,17% kalus, sebanyak 53,63% yang dinyatakan sebagai kalus embriogenik yang dapat dipindahkan ke media regenerasi selanjutnya.

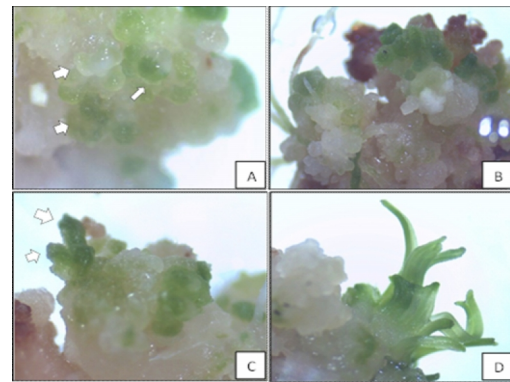
Peningkatan konsentrasi 2,4-D menjadi 4 mg/l menurunkan prosentase kalus embriogenik secara drastis sampai pada kisaran 14,8%. Hal tersebut mengindikasikan bahwa meskipun pertumbuhan kalus akan terus

meningkat seiring peningkatan konsentrasi 2,4-D, akan tetapi pertumbuhan kalus embriogenik yang optimal hanya akan dicapai pada konsentrasi 2,4-D tertentu yang tepat dan dapat direspon dengan baik oleh faktor internal tanaman.

Berdasarkan hasil penelitian ini, padi varietas Ciherang hanya akan menghasilkan kalus embriogenik dengan jumlah maksimal pada konsentrasi 2,4-D 3 mg/l dalam media. Peningkatan konsentrasi 2,4-D secara terus menerus akan menurunkan prosentase kalus embriogenik disebabkan karena sel tanaman menjadi stres dan tidak dapat mentoleransi efek fitotoksik 2,4-D.

Frekuensi Regenerasi Kalus Embriogenik

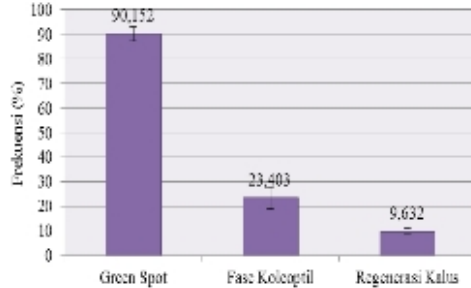
Pada umur 1 HST pada media RM2, kalus-kalus embriogenik tersebut masih berada pada fase globular dan skutelar. Fase globular pada embrio somatik (Gambar. 4A dan 4B) dicirikan oleh bentuk sel nodular yang kecil dengan sitoplasma padat, sementara pada fase skutelar, kalus globular mengalami perkembangan menjadi bentuk terpedo sebagai cikal bakal munculnya tunas (Gambar. 4C).



Gambar 4. Tahap Perkembangan Kalus Embriogenik menuju Regenerasi. A-B) Fase globular, C) Fase skutelar, D) Fase koleoptil

Prosentase frekuensi regenerasi eksplan kalus embriogenik dapat dihitung dengan perhitungan perbandingan antara total kalus yang beregenerasi dengan total kalus embriogenik. Hasil (gambar 5) menunjukkan bahwa rata-rata frekuensi kemunculan bintik hijau mencapai 90,2%. Sebagian bintik hijau tersebut mengalami *browning* dan tidak mampu melanjutkan ke fase perkembangan kalus selanjutnya dan sebanyak 23,4% kalus

dengan bintik hijau mampu berlanjut menuju fase koleoptil. Frekuensi regenerasi yang dicapai adalah sebesar 9,6%.



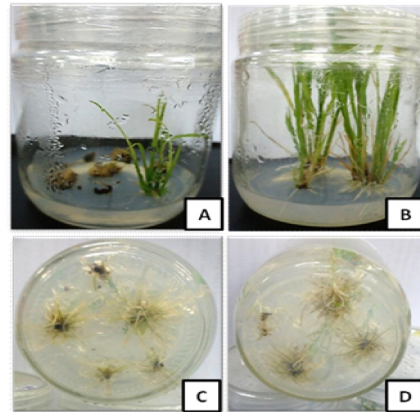
Gambar 5. Grafik frekuensi proses regenerasi kalus embriogenik

Frekuensi kemunculan bintik hijau sebesar 90,2% menunjukkan hasil yang tinggi. Hasil ini mengindikasikan bahwa padi Ciherang memiliki probabilitas efisiensi yang tinggi apabila dilanjutkan pada kegiatan transformasi genetik kendati demikian, peristiwa browning yang terjadi pada kalus yang memiliki bintik hijau memberikan dampak pada penurunan kemunculan tunas setelah bintik hijau. Hal ini dapat dilihat pada tunas yang muncul sebesar 23,4% dari total bintik hijau.

Timbulnya browning diduga dikarenakan karena ketidakseimbangan komposisi nutrisi pada media yang menyebabkan terbentuknya quinon pada kalus dan terjadinya proses oksidasi polifenol (Husain *et al.*, 2011). Senyawa fenolik tersebut terakumulasi di dalam vakuola, sehingga akan tercampur dengan isi plastida dan organel lain dan memunculkan pigmentasi gelap. Hal tersebut merupakan senyawa reaktif dan bersifat toksik karena berpolimer secara cepat membentuk ikatan dengan protein dan juga menghambat aktivitas enzim sehingga menghasilkan *browning* yang bersifat letal (Grewal *et al.*, 2005).

Tunas yang muncul sebesar 23,4% dari total bintik hijau mengalami kegagalan dalam melanjutkan pertumbuhannya menjadi planlet utuh. Hal ini disebabkan karena tunas yang beregenerasi mengalami peristiwa albino dan *browning* sehingga total tunas yang dapat melanjutkan pertumbuhannya menjadi planlet utuh hanya sebesar 9,6%. Hasil tersebut menunjukkan adanya tingkat efisiensi regenerasi yang berbeda jika dibandingkan pada penelitian Sulistyowati *et al.*, (2011) yang mendapatkan efisiensi regenerasi pada padi Ciherang sebesar 10,22% dan Purnamaningsih (2006) dengan

daya regenerasi padi Ciherang mencapai 69%.



Gambar 6. Regenerasi tanaman padi var. Ciherang. A) umur 3 minggu B) umur 5 minggu C-D) perakaran umur 5 minggu.

Pertumbuhan planlet dari fase koleoptil menuju planlet lengkap membutuhkan waktu rata-rata tiga minggu. Subkultur dilakukan dua kali dengan interval waktu rata-rata dua minggu untuk kemudian planlet siap diaklimatisasi.

Hasil menunjukkan bahwa pada umur tiga minggu di media regenerasi, kalus rata-rata telah membentuk 2 planlet (Gambar. 6A). Pada umur lima minggu (Gambar. 6B) pada media regenerasi rata-rata jumlah planlet yang terbentuk adalah 11 planlet serta telah muncul sistem perakaran dan diaklimatisasi (gambar 6C dan 6D).

Keberadaan planlet albino disebabkan karena kondisi kultur yang tidak cocok baik dari segi suhu inkubasi dan komposisi medium yang tidak sesuai bagi tanaman (International Rice Research Institute, 1983). Sangat disarankan untuk menggunakan suhu yang stabil pada kisaran 27°C-28°C. Jika suhu yang digunakan terlalu tinggi pada kisaran 30°C menyebabkan tanaman rekalsitrasi menjadi peka dan mengalami perubahan sistem fisiologis yang berperan dalam pertumbuhannya.

KESIMPULAN

Disimpulkan bahwa media CIM 4 menggunakan 2,4-D 4 mg/l memberikan hasil optimum untuk menginduksi kalus terbanyak dengan prosentase 57,63%. Akan tetapi, media CIM 3 dengan menggunakan 2,4-D 3 mg/l menghasilkan kalus embriogenik paling

maksimal dibandingkan media CIM yang lainnya, yaitu dengan prosentase 53,63%. Hasil regenerasi kalus embriogenik menunjukkan frekuensi regenerasi yang dicapai adalah sebesar 9,6%. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa penelitian dapat dilanjutkan dengan melakukan transformasi genetik pada padi Ciherang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan dukungan finansial melalui dana hibah MP3EI dan Prof. Bambang Sugiharto sebagai pemilik proyek.

DAFTAR PUSAKA

- Gaj M.D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation* 43: 27-47
- George, E. F., M. A. Hall, dan G. J. de Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Dordrecht: The Netherland
- Grewal, D., R. Gill, dan S.S. Gosal. 2005. Factors Enhancing Induction of High Frequency Plant Regeneration from Somatic Embryos of Indica Rice (*Oryza sativa* L.). *Jour. Bio. Sci* 5(6): 697-702
- Haensch, K.T. 2007. Influence of 2,4-D and BAP on callus growth and the subsequent regeneration of somatic embryos in long-term cultures of *Pelargonium x domesticum* cv. Madame Layal. *Elec. Jour. of Biotech.* : 69-77
- Husain, A., S. N. H. Nazir dan Z.K. Shinwari. 2011. Tissue culture of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 43(2): 1069-1078
- International Rice Research Institute. 1983. *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crops Improvement*. Beijing: Science Press
- Khatun, M. M. Mahmuda, H. Ali, & N. V. Desamero. 2003. Effect of Genotype and Culture Media on Callus Formation and Plant Regeneration from Mature Seed Scutella Culture in Rice. *Plant Tissue Cult.* 13(2) : 99-107
- Kishor P.B.K, S. Sangam, & Naidu K.P. 1999. Sodium, Potassium, Sugar, alcohol and proline mediated somatic embryogenesis and plant regeneration in recalcitrant rice callus. *Plant Tissue Cult. Biotech. Emerging Trends. Proc. Symp* : 78-85
- Libin, A., P. J. H. King, K. H. Ong, J. K. Chubo & P. Sipe. 2012. Callus induction and plant regeneration of Sarawak rice (*Oryza sativa* L.) variety Biris. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 7(30): 4260-4265
- Meneses, A., D. Flores, M. Munoz, G. Arrieta, A.M. Espinosa. 2005. Effect of 2,4-D, Hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Rev Biol Trop (Int J)* 53(3-4): 361-368
- Mondal, S., R. P. Singh, C. Sen dan B. Bose. 2011. Study of Physiological Potentiality of Callus and Plant Regeneration through Somatic Embryogenesis in Rice Variety Swarna. *Am. J. Plant Physiol.* 6(2): 91-98
- Petrasek, J. Elckner, Morris D.A., dan Zazimalova. 2002. Auxin Efflux Carrier Activity & Auxin Accumulation Regulate Cell Division and Polarity in Tobacco Cells. *Planta* 216: 302-308
- Purnamaningsih, R. 2006. Induksi Kalus dan Optimasi Regenerasi Empat Varietas Padi melalui Kultur In Vitro. *Jurnal AgroBiogen* 2(2): 74-80
- Quiroz-Figueroa F., Rojas-Herrera R, Galaz-Avalos R.M, Loyola-Vargas V.M. 2006. Embryo Production Through Somatic Embryogenesis Can be Used to Study Cell Differentiation in Plants: *Review Paper. Plant Cell Tiss Organ Cult.* 86: 285-301
- Saad, A. I.M. & Ahmed M. E. 2012. *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. Libya: Intech
- Sahoo, K. K., Amit K. T., Ashwani P., Sudhir K. S., & Sneh L. S-P. 2011. An Improved Protocol for Efficient Transformation and Regeneration of Diverse Indica Rice Cultivars. *Plant Methods* 7:49-60
- Shubashini, K. & G.M. Reddy, 1991. Role of Proline in Callus Growth and Plant Regeneration Under Salt Stress in Rice. *Proc. Indian Naim. Sci. Acad.* B57 (1): 81-84
- Suprihatno, B., Aan A. D., Satoto, Baehaki S.E., I. N. Widiarta. 2009. *Deskripsi Varietas Padi*. Subang: Balai Besar Penelitian Tanaman Padi
- Sulistyowati, Y., Agus R., Fatimah Z., Syamsidah R., & Satya N. 2011. Genetic transformation of rice cv. Ciherang using double T-DNA vector harboring cry1Ab

- gene. *Annales Bogorienses* Vol. 15.1 : 27-32
- Szabados, L. & Arnould S. 2009. Proline: a Multifunctional Amino Acid. *Trends in Plant Science* 15 (2): 89-97
- Zhang Y, Chautler S.E., Gupta S., Zhao Y., Hannah, L.C, Meyer C., Weston J., Wu M-X., Preiss J., dan Okita T.W. 1996. Molecular Approaches to Enhance Rice Production Through Manipulation of Starch Metabolism During Seed Development. *Proc. Third Int'l Rice Gen. Symp:*809-813

