

FUSI PROTOPLAS

OLEH
SYUKUR, SP, MP

WIDYAIKWARA PERTAMA
BALAI PELATIHAN PERTANIAN JAMBI

ABSTRAK

Syukur, SP, MP. 2014. Fusi Protoplas Protoplas diistilahkan sebagai sel tanaman tanpa dinding sel, karena dinding selnya telah dihilangkan baik secara mekanik maupun secara enzimatik. Teknologi yang membantu pemuliaan (1) kultur embrio, ovul dan ovarium membantu tercapainya tujuan pemuliaan secara konvensional,(2) pendekatan *parasexual* yang melibatkan protoplas yang mengarah terciptanya genotipe, yang tidak dapat dicapai dengan pemuliaan tanaman secara konvensional. Faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas protoplas yang diperoleh adalah komposisi dan konsentrasi enzim, PH, intensitas cahaya, suhu, waktu inkubasi, konsentrasi osmotikum dan zat-zat kimia (Evan dan Bravo, 1983). Kebanyakan pembentukan media kultur kloroplas dibagi dua katagori yaitu media biasa dan media kultur komplek. Tunas yang terbentuk setelah umur 10-15 hari dilakukan pada medium 1/5 M S+0,2 mg/l I B A untuk menghasilkan pantlet.

Pembentukan tunas dari kalus frekuensinya sekitat ± 30 % ditingkatkan dengan penambahan glutamin, asparagin dan GA₃, selanjutnya dilakukan pemindahan ke 1/5 MS + 0,01 mg/l thidiazuron + 1,5 mg/l GA₃. Pembentukan akar terjadi pada medium 1/5 MS + 1 % sukrosa + 0,2 mg/l I B A atau 0,5 mg/l N A A dan menghasilkan 26 tanaman.

Kata kunci : Fusi prtotoplas, perbanyak tanaman

I.PENDAHULUAN

Teknologi perbanyakan secara *in vitro* secara luas telah digunakan sebagai teknologi yang dapat melengkapi atau membantu pemuliaan tanaman secara konvensional untuk pengembangan varietas tanaman. Teknologi tersebut membantu pemulia tanaman dengan dua cara: (1) kultur embrio, ovul dan ovarium membantu tercapainya tujuan pemuliaan secara konvensional, (2) pendekatan *parasexual* yang melibatkan protoplas yang mengarah terciptanya genotipe, yang tidak dapat dicapai dengan pemuliaan tanaman secara konvensional (Evans dan Bravo, 1983).

Protoplas merupakan bahan yang dipilih sebagai bahan yang dapat dikombinasikan dengan gen asing dari individu yang lainnya dengan cara hibridisasi somatik. Tersedianya sistem regenerasi protoplas menjadi tanaman sangat penting untuk manipulasi sifat tanaman. Keberhasilan kultur protoplas dalam menghasilkan tanaman utuh dipengaruhi beberapa faktor yaitu: genetik tanaman, jaringan yang digunakan sebagai sumber protoplas, kemurnian enzim dan plasmolitikum, periode inkubasi, media kultur dan zat pengatur tumbuh, kerapatan protoplas, metode kultur dan kondisi lingkungan kultur (Bajaj, 1989).

Protoplas diperoleh secara enzimatik dari jaringan tanaman melalui proses perenggangan ikatan sel dalam jaringan, pelepasan sel-sel tunggal, kemudian dilanjutkan dengan hancurnya dinding sel dari sel-sel tunggal tersebut sehingga yang tertinggal hanyalah protoplas. Tetapi dalam beberapa kasus, viabilitas protoplas akan menurun selama proses isolasi secara enzimatik tersebut (Ishii, 1989). Pada tanaman pepaya isolasi protoplas pernah dilakukan oleh Chen dan Chen (1992). Mereka menggunakan embrio globular sebagai sumber protoplas. Enzim yang digunakan adalah 2.0% (w/v) Cellulase R-10, 0.2% (w/v)

Driselase dan 0.6% (w/v) Macerozyme R-10. Untuk mendapatkan sumber eksplan tersebut, pertama kali yang harus dilakukan adalah menginduksi embrio somatik dalam waktu yang relatif lama. Sumber protoplas lain yang dapat digunakan adalah jaringan mesofil daun. Sel-sel mesofil tersebut lebih umum digunakan karena mudah diperoleh.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Protoplas diistilahkan sebagai sel tanaman tanpa dinding sel, karena dinding selnya telah dihilangkan baik secara mekanik maupun secara enzimatik. Istilah protoplas pertama kali diperkenalkan oleh Hanstein (1880) yang menunjukkan zat hidup tanpa dinding sel (Fahn, 1991)

Sel-sel tanaman saling di hubungkan satu sama lain melalui plasmodesmata membentuk jaringan. Ketika di Isolasi protoplas, di hasilkan suspense sel tunggal dari jaringan, Suspensi protoplas terdapat sel tunggal, oleh karena itu dapat digunakan untuk mempelajari proses fisiologi genetic dan biokimia, Selain itu juga digunakan untuk studi mikrobiologi, membran sel, isolasi vacuola dari protoplas, organel sel, cloning sel, dan fusi sel (Dodds dan Roberts, 1985)

Protoplas dapat digunakan sebagai bahan manipulasi genetik dan perbaikan tanaman. Tanaman yang didapat dari regenerasi protoplas menunjukkan keragaman genetik yang tinggi. untuk mendapatkan hibrida somatik (Narayaswamy, 1994). Trasformasi genetic tanaman dapat dilalui melalui transfer DNA ke protoplas (Dodds, 1985).

2.1. Isolasi Protoplas

Metode Isolasi

Protoplas adalah sel yang dihilangkan dinding selnya. Dinding sel dapat dihilangkan/dihancurkan secara mekanik dan enzimatik. Isolasi secara mekanik pertama kali dilakukan pada tahun 1882. Jaringan tanaman dipotong dengan protoplas.

Pemilihan enzim yang digunakan untuk isolasi protoplas berkaitan erat dengan struktur dari dinding sel yang menyusun sel tumbuhan itu. Dinding sel tumbuhan dikotil terdiri atas 3 lapisan yakni lamela tengah, dinding primer dan dinding skunder. Lamela tengah tersusun atas pectin, dinding primer tersusun atas selulosa, hemiselulosa, protein dan air. Dan dinding skunder tersusun atas selulosa, lignin. Selulosa merupakan polimer linier dari glukosa dengan ikatan β -1,4. Di dalam dinding sel, selulosa dalam bentuk mikropibril yang diselubungi siloglukan. Mikropibril satu dengan yang lain di hubungkan oleh pectin. Pektin didalam dinding sel ada 2 macam yaitu pectin netral dan asam pectin. Kandungan dasar pectin adalah asam poligalakturonat (PGA) yaitu asam (1-4) β -D galakturonat homopolimer berbentuk heliks dan ramnogalakturonat yaitu asam (1-2) β -D ramnosa (1-4) α -D galakturonat heteropolimer. Selulase berfungsi menghidrolisis subtrat helulose. Masarozim berfungsi memotong ikatan α asam galakturonat. Disamping itu masarozim berfungsi melarutkan lamella tengah sehingga memisahkan sel dari jaringan (Evan dan Bravo, 1983). Narayaraswamy, 1994 meyatakan selulose dipakai pada kisaran antara 0,2-2 % dan mesorozim yang kaya pektinase digunakan pada kisaran antara 0,1-2%.

Faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas protoplas yang diperoleh adalah komposisi dan konsentrasi enzim, PH, intensitas cahaya, suhu, waktu inkubasi, konsentrasi osmotikum dan zat-zat kimia (Evan dan Bravo, 1983). Komposisi dan konsentrasi enzim tergantung pada spesies tanaman dan sumber jaringan untuk menghasilkan protoplas. Pada berbagai tanaman, selulosa dan maserozim umumnya banyak digunakan (Bojwani dan Rasdan, 1983). Aktifitas enzin ditentukan oleh PH yang digunakan dan PH larutan enzim adalah 4,6-6. Suhu yang digunakan untuk inkubasi jaringan dalam larutan enzim selama semalam umumnya adalah sekitar 25-30°C.

2.2. Pemurnian protoplas dan penentuan densitas protoplas

Powke dan Constabel (1985) mengemukakan bahwa protoplas dimurnikan melalui filtrasi, sentrifugasi dan pencucian. Protoplas dalam larutan enzim disaring melalui saringan stainless steel (50-100 μm), ditambahi larutan sukrosa, (15-21 %). Protoplas akan mengapung di atas larutan sukrosa setelah disentrifugasi 100xg selama 7-10 menit. Pencucian dilakukan dengan mensuspensi protoplas dalam larutan osmotik yakni monitol, sorbitol atau garam-garam. Pencucian dilakukan 3 kali. Penentuan densitas protoplas diukur dengan haemositometer. Densitas optimum tembakau berkisar berkisar 5×10^4 protoplas ml (Narayaswamy, 1994).

2.3. Fusi Protoplas

Protoplas dapat berfusi secara spontan selama isolasi atau pada kondisi khusus. Selama isolasi, fusi spontan dapat terjadi diantara 2 atau lebih protoplas yang berdekatan. Proses ini terjadi ketika plasmodesmata antara 2 protoplas berdekatan yang berdekatan memanjang dan menghasilkan penggabungan material sitoplasmik dan nucleus menjadi satu unit (Evans, 1983).

Fusi protoplas dari sumber yang berbeda jarang terjadi secara spontan dan harus diinduksi dengan beberapa perlakuan untuk menghasilkan kontak diantara protoplas yang berdekatan. Jika protoplas yang difusikan dari tanaman yang berbeda, hasil fusi akan mengandung materi seluler yang berasal dari dua sumber berbeda yang disebut hibrida. Pada kondisi yang cocok, regenerasi tanaman dapat terjadi untuk menghasilkan hibrida somatic (Dodds dan Robert, 1985).

Variabilitas yang dihasilkan dari peristiwa fusi lebih tinggi bila dibandingkan dengan persilangan seksual. Menurut Evans (1983), variabilitas terjadi disebabkan oleh antara lain: 1). Ketidak stabilan kombinasi inti sel yang menyebabkan hilangnya beberapa informasi genetic, 2). Terjadinya segregasi inti dan sithoplasma yang menghasilkan suatu kombinasi yang unik antara kombinasi informasi genetic pada inti dan sithoplasma. Sel hybrid dari spesies yang berkerabat jauh umumnya tidak dapat diregenerasikan. Hasil fusi protoplas menghasilkan campuran antara sel-sel tetua, fusan yang homokarion dan heterokarion (hybrid). Fusi yang homokarion diharapkan dari peristiwa fusi protoplas. Sebanyak 30-40% fusan heterokarion mengandung satu inti dari salah satu tetua, namun dapat juga multi inti. Dalam beberapa kasus, fusi ganda menjadi metode penting untuk menghasilkan jumlah kromosom yang besar.

Fusi dapat diinduksi dengan beberapa cara antara lain dengan NaNO_3 , asam lemak, ion kalsium dan PH tinggi dekstran sulfat, polipenil alcohol, NVA), polietilen glikol (PEG) dan induksi fusi dengan arus listrik. Salah satu metode fusi yang mempunyai keberhasilan tinggi adalah penambahan polietilen glikol (PEG) pada campuran protoplas. Proses fusi diawali dengan aglutinasi protoplas tanaman oleh PEG. Aglutinasi akan terjadi jika PEG yang mempunyai berat molekul tinggi (600-8000) pada konsentrasi 25-30 % ditambahkan pada suspensi protoplas. Polietilen glikol ($\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{-O-CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$) adalah bahan kimia yang larut dalam air. PEG dalam air mempunyai sedikit muatan negative dan mampu membentuk ikatan hydrogen dengan membrane plasma pada protoplasma. PEG berfungsi sebagai jembatan antara dua protoplas yang menyebabkan agregasi. Agregasi meningkat dengan pemberian CA^{2+} , karena adanya CA^{2+} akan

membentuk jembatan antara membrane dan PEG. Protoplas akan berfusi setelah dilakukan pencucian protoplas dengan larutan pencuci (Powke dan Constabel, 1985).

2.4. Kultur Protoplas

Fenomena sel-sel tanaman bersifat totipotensi, yaitu kemampuan untuk bergenerasi secara utuh, membuat kultur protoplas menjadi mungkin. Langkah pertama dalam kultur protoplas adalah regenerasi dinding sel sekitar protoplas. Ketika dinding sel terbentuk, pembelahan sel harus diinduksi dalam sel baru. Setelah terjadi pembelahan sel, selanjutnya akan terjadi pembelahan sel kecil yang dapat diamati secara kasab mata (Evans dan Baravo, 1983).

Penggunaan media cair dalam cawan petri untuk menumbuhkan protoplas umumnya digunakan umumnya pada berbagai tanaman. Dengan metode ini protoplas dapat disuspensi dalam medium cair dengan densitas protoplas yang rendah dan ditutupi paraffin yang bertujuan untuk mengurangi air. Dalam media cair pertumbuhan protoplas lebih baik dan memudahkan pergantian media. Keuntungan media cair adalah osmolaritas medium kultur relative tetap, regenerasi sel yang cukup tinggi dan dengan densitas protoplas yang rendah tetap memungkinkan untuk pertumbuhan (Fowke dan Constabel 1985).

Faktor yang mempengaruhi pembelahan sel meliputi: Genotif tanaman, medium kultur, lingkungan kultur dan jaringan yang digunakan untuk isolasi protoplas (Evans dan Baravo, 1983). Laju regenerasi dinding sel bergantung pada jenis tanaman dan sumber material untuk isolasi protoplas. Sel mesofil *Nicotiana*, *Petunia*, *Datura* dan *Brassica* mengalami pembentukan dinding sel baru sangat cepat, dan dalam 24 jam

bentuk spiral dari protoplas berubah menjadi bentuk oral. Dan protoplas dari daun sereal dan legumes membentuk dinding sel dalam 4 hari. Disamping itu factor genetic dapat mempengaruhi pembentukan dinding sel. Penambahan 2,4 D dan Ziatin juga penting untuk mengatur pembelahan sel (Evans dan Baravo, 1983).

2.5. Media Kultur

Media dasar yang digunakan untuk kultur protoplas sama seperti yang digunakan untuk kultur sel. Media yang biasa digunakan dimodifikasi untuk menjaga agar suspensi protoplas agar tetap hidup dan dapat membentuk koloni sel. Kebanyakan pembentukan media kultur kloroplas dibagi dua katagori yaitu media biasa dan media kultur kompleks. Media biasa didefinisikan sebagai media yang terdiri dari unsur hara mikro dan makro ditambahkan dengan beberapa vitamin. Sedangkan media kultur kompleks didefinisikan media yang terdiri dari unsure hara mikro dan makro, vitamin, bahan organic yang lebih kompleks bila disbanding media biasa. Media dasar G₅ (Gamborg et al., 1968) dikategorikan media biasa sementara KM (Kao dan Michayluck, 1975) dikategorikan dalam media kultur kompleks. Media kultur dapat pula diperkaya dengan penambahan air kelapa muda, kasein hidrolisat atau ekstra ragi. Bahan organic dan anorganik diperlukan dalam media kultur. Sejumlah protoplas tumbuh lebih baik dalam media dengan kandungan nitrat dan kalsium rendah. Beberapa studi mendapatkan amonium nitrat dan kalsium bermanfaat untuk regenerasi protoplas. Bahan organic sukrosa dan glukosa merupakan kelompok karbohidrat yang digunakan dalam media kultur. Glukosa berfungsi sebagai osmotikum dan sumber karbon. Karbohidrat lain seperti mannose, fruktosa, ribose, silose, rhamnase, sellobiose, berperan dalam pembentukan dinding sel seperti hemiselulosa dan pectin. Asam organic

seperti asam sitrat, asam malat, dan fumarat mendorong pertumbuhan protoplas (Fowke dan Constabel 1985).

2.6. Regenerasi Tanaman

Regenerasi tanaman dari sel atau protoplas dapat terjadi melalui 2 jalur yakni organogenesis dan embryogenesis somatic. Organogenesis didefinisikan transformasi sel tunggal, kalus atau jaringan menjadi struktur organ (Pardan et al., 1975). Embriogenesis somatic dapat terjadi secara tidak langsung (dari kalus) atau langsung (tampa melalui fase kalus) Embrio somatic mengalami tahap perkembangan yang sama dengan embrio biji yakni bentuk glubolar, hati dan torpedo sehingga terbentuk tanaman utuh. Kemampuan untuk berbagai hormon dapat mempengaruhi arah morfogenesis Dengan modifikasi medium kultur memungkinkan untuk menumbuhkan protoplas untuk membentuk kalus (Dodds, 1985).

Regenerasi protoplas telah berhasil dilakukan dari eksplan yang berasal kalus, suspensi sel, tunas daun dan petal. Metode regenerasi bergantung pada spesies dan jaringan. Dalam beberapa kasus konsentrasi auksin dibutuhkan lebih tinggi dari sitokinin (Evans dan Baravo, 1983).

Wei dan Xu (1988) yang telah berhasil meregenerasi tanaman dari protoplas kedelai, 86 tanaman berhasil diregenerasi dari 6 kultivar *Glicine max*(L). Regenerasi kalus untuk membentuk tunas dapat diinkubasi dalam medium M S (Murashige dan Skoog , 1962) dengan penambahan vitamin B₅. Pembentukan tunas dapat ditingkatkan sampai 34,60 % bila medium tersebut diberi 0,5 ml/l B A, kinetin, ziatin kombinasi dengan 500

mg/l kasein hidrolisat. Tunas yang terbentuk setelah umur 10-15 hari dilakukan pada medium 1/5 M S+0,2 mg/l I B A untuk menghasilkan pantlet.

Dhir et al.,(1991) memodifikasi perlakuan zat pengatur tumbuh seperti yang telah dilakukan Wei dan Xu (1988). Pembentukan tunas dari kalus frekuensinya sekitat $\pm 30\%$ ditingkatkan dengan penambahan glutamin, asparagin dan GA₃, selanjutnya dilakukan pemindahan ke 1/5 MS + 0,01 mg/l thidiazuron + 1,5 mg/l GA₃. Pembentukan akar terjadi pada medium 1/5 MS + 1 % sukrosa + 0,2 mg/l I B A atau 0,5 mg/l N A A dan menghasilkan 26 tanaman.

III. KESIMPULAN

1. Protoplas diistilahkan sebagai sel tanaman tanpa dinding sel, karena dinding selnya telah dihilangkan baik secara mekanik maupun secara enzimatik. Istilah protoplas pertama kali diperkenalkan oleh Hanstein (1880) yang menunjukkan zat hidup tanpa dinding sel (Fahn, 1991).
2. Protoplas dapat digunakan sebagai bahan manipulasi genetik dan perbaikan tanaman. Tanaman yang didapat dari regenerasi protoplas menunjukkan keragaman genetik yang tinggi.
3. Faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas dan kualitas protoplas yang diperoleh adalah komposisi dan konsentrasi enzim, PH, intensitas cahaya, suhu, waktu inkubasi, konsentrasi osmotikum dan zat-zat kimia (Evan dan Bravo, 1983)
4. Protoplas dapat berfusi secara spontan selama isolasi atau pada kondisi khusus. Selama isolasi, fusi spontan dapat terjadi diantara 2 atau lebih protoplas yang berdekatan.
5. Faktor yang mempengaruhi pembelahan sel meliputi: Genotif tanaman, medium kultur, lingkungan kultur dan jaringan yang digunakan untuk isolasi protoplas
6. Regenerasi tanaman dari sel atau protoplas dapat terjadi melalui 2 jalur yakni organogenesis dan embryogenesis somatic.

IV. DAFTAR PUSTAKA

Balai Penelitian Tanaman Buah Solok, 2008. Isolasi dan Purifikasi Protoplas dari Mesofil Daun Pepaya yang Berasal Dari Kultur *In Vitro*

Dodds, JH. 1985. Plant Genetic Engineering Cambridge. Cambridge University Press.

Evans DA, Bavo JE. 1983. Protoplas Isolation culture. In Evans DA, Sarp WR, Ammirato PV, Yamaha Y, eds Handbook of plant cell culture. Vol 1. New York. Macmillan: Publishing Company.

Fahr, A. 1991. Anatomi Tumbuhan (Terjemahan) Ed-3. Yogyakarta. Gajah Mada University Press.

Rahmawati Lina. 2004. Usaha Pembentukan Hibrida Somatik Dari Protoplasma Kedelai Budidaya *Glycine max* (L) Merrill dan Kerabat Liarnya *Glycine tomentosa* Hayata.