

# FUSI

## PROTOPLAS



Dr.sc.agr. Nurhasanah, SP., MSi.  
Widi Sunaryo, SP., MSi., PhD.

FUSI PROTOPLAS



# FUSI

## PROTOPLAS

PT Penerbit IPB Press

Jalan Taman Kencana No. 3, Bogor 16128

Telp. 0251 - 8355 158 E-mail: penerbit.ipbpress@gmail.com

Penerbit IPB Press @IPBpress ipbpress www.ipbpress.com



Dr.sc.agr. Nurhasanah, SP., MSi.  
Widi Sunaryo, SP., MSi., PhD.

**FUSI**

**PROTOPLAS**

**Untuk**

*Ariq, Ammar, Alma dan Athar  
Semoga dapat menginspirasi kalian  
untuk senantiasa berkarya bagi masyarakat*

# FUSI

## PROTOPLAS

**Penulis:**

Dr.sc.agr. Nurhasanah, SP., MSi.  
Widi Sunaryo, SP., MSi., PhD.



**Penerbit IPB Press**

Jalan Taman Kencana No. 3,  
Kota Bogor - Indonesia

C.01/12.2019

**Judul Buku:**

FUSI PROTOPLAS

**Penulis:**

Dr.sc.agr. Nurhasanah, SP., MSi.

Widi Sunaryo, SP., MSi., PhD.

**Editor:**

Pratama Desriwan

Dwi Murti Nastiti

**Desain Sampul & Penata Isi:**

Syahrival

**Jumlah Halaman:**

180 + 12 halaman romawi

**Edisi/Cetakan:**

Cetakan 1, Desember 2019

**PT Penerbit IPB Press**

Anggota IKAPI

Jalan Taman Kencana No. 3, Bogor 16128

Telp. 0251 - 8355 158 E-mail: penerbit.ipbpress@gmail.com

www.ipbpress.com

ISBN: 978-623-256-000-0

Dicetak oleh Percetakan IPB, Bogor - Indonesia

Isi di Luar Tanggung Jawab Percetakan

© 2019, HAK CIPTA DILINDUNGI OLEH UNDANG-UNDANG

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku tanpa izin tertulis dari penerbit

# KATA PENGANTAR

## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Puji dan syukur kami panjatkan kehadiran Allah yang maha kuasa atas limpahan berkah dan rahmatNya sehingga buku yang berjudul “Fusi Protoplasma” ini bisa diselesaikan. Penulisan buku ini bertujuan untuk memberikan informasi yang lengkap dan mendalam mengenai salah satu teknologi yang pernah *booming* dalam bidang Bioteknologi Tanaman, yaitu Fusi Protoplasma. Walaupun teknologi ini sekarang seolah tenggelam dibalik maraknya penelitian dibidang Rekayasa Genetika, tetapi bidang penelitian ini masih tetap menarik dan produktif dilakukan hingga saat ini. Di dalam buku ini juga disampaikan beberapa literatur dari publikasi penelitian terbaru yang menunjukkan perkembangan penelitian dan aplikasi Fusi Protoplasma masih sangat menarik untuk dikaji dan dipelajari. Pada beberapa spesies tanaman, teknik ini bahkan menjadi solusi yang sangat berguna untuk menghasilkan varietas-varietas unggul baru.

Informasi mengenai fusi protoplasma dalam literatur yang berbahasa Indonesia masih sangat terbatas. Oleh karena itu melalui buku ini diharapkan dapat memberikan wawasan yang komprehensif mengenai teknologi ini kepada pembaca, khususnya yang tertarik dalam bidang Bioteknologi tanaman, atau yang ingin terjun meneliti dan menyemarakkan kembali teknologi Fusi Protoplasma.

Akhir kata penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang ikut membantu dalam penerbitan buku ini, terkhusus kepada Bapak Prof. Dr. Ir. Agus Purwito, M.Sc.Agr., yang merupakan salah seorang pakar Fusi Protoplasma di Indonesia yang menginspirasi penulis untuk menerbitkan buku ini.

Samarinda, Desember 2019

Penulis

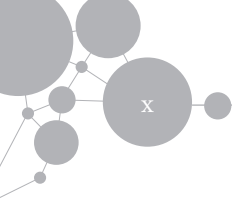
# DAFTAR ISI

|   |            |
|---|------------|
| <b>KATA PENGANTAR.....</b>  | <b>iii</b> |
| <b>DAFTAR ISI.....</b>  | <b>vii</b> |
| <b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>  | <b>1</b>   |
| <b>BAB 2 SEJARAH PERKEMBANGAN FUSI<br/>PROTOPLAS .....</b>                    | <b>5</b>   |
| <b>BAB 3 ISOLASI PROTOPLAS.....</b>   | <b>11</b>  |
| <b>A. Metode mekanik .....</b>  | <b>14</b>  |
| <b>B. Metode kimia.....</b>   | <b>18</b>  |
| <b>BAB 4 PEMURNIAN DAN PENGUJIAN VIABILITAS<br/>PROTOPLAS .....</b>           | <b>27</b>  |
| <b>A. Pemurnian Protoplasma.....</b>  | <b>27</b>  |
| 1. Filtrasi .....   | 27         |
| 2. Sedimentasi dan pencucian.....   | 28         |
| 3. Floatasi (pemisahan protoplas dengan<br>pengapungan).....                  | 28         |
| 4. Metoda densitas buffer .....   | 29         |
| <b>B. Menghitung Kerapatan Protoplasma .....</b>                              | <b>29</b>  |
| <b>C. Pengujian Viabilitas Protoplas .....</b>                                | <b>33</b>  |
| <b>D. Faktor yang mempengaruhi viabilitas dari<br/>        protoplas.....</b> | <b>36</b>  |



|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| <b>BAB 5</b> | <b>METODA FUSI PROTOPLAS .....</b>                          | <b>39</b> |
| <b>A.</b>    | <b>Metode fusi spontan.....</b>                             | <b>39</b> |
| <b>B.</b>    | <b>Metode induksi fusi .....</b>                            | <b>40</b> |
| 1.           | Fusi mekanik .....  | 40        |
| 2.           | Kemofusi.....   | 41        |
| 3.           | Elektrofusi.....  | 43        |
| <b>BAB 6</b> | <b>MEKANISME FUSI PROTOPLAS .....</b>                       | <b>45</b> |
| <b>BAB 7</b> | <b>IDENTIFIKASI DAN SELEKSI HIBRIDA<br/>HASIL FUSI.....</b> | <b>47</b> |
| <b>A.</b>    | <b>Seleksi secara visual.....</b>                           | <b>47</b> |
| <b>B.</b>    | <b>Fluorescence Label .....</b>                             | <b>49</b> |
| <b>C.</b>    | <b>Seleksi secara Komplemen .....</b>                       | <b>49</b> |
| 1.           | Komplemen dari Marka Resistensi:.....                       | 49        |
| 2.           | Penggunaan Inhibitor/Penghambat<br>Metabolik:.....          | 49        |
| 3.           | Pelengkap Auxotroph .....                                   | 50        |
| 4.           | Komplementasi Kekurangan Klorofil.....                      | 50        |
| <b>BAB 8</b> | <b>KULTUR DAN REGENERASI PROTOPLAS .....</b>                | <b>51</b> |
| <b>A.</b>    | <b>Pembentukan Dinding Sel .....</b>                        | <b>51</b> |
| <b>B.</b>    | <b>Regenerasi Protoplasma .....</b>                         | <b>53</b> |
| <b>C.</b>    | <b>Metode Kultur Protoplasma.....</b>                       | <b>58</b> |
| <b>D.</b>    | <b>Media Kultur Protoplas .....</b>                         | <b>61</b> |
| <b>E.</b>    | <b>Kepadatan Kultur Protoplas .....</b>                     | <b>63</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>BAB 9 VERIFIKASI DAN KARAKTERISASI TANAMAN HASIL HIBRIDA SOMATIK.....</b>                | <b>65</b> |
| <b>A. Karakter Morfologis .....</b>   | <b>65</b> |
| <b>B. Analisis Isoenzyme .....</b>  | <b>67</b> |
| <b>C. Pengamatan Kromosom .....</b>   | <b>68</b> |
| <b>D. Teknik Molekuler.....</b>   | <b>73</b> |
| <b>BAB 10 FUSI SIMETRIS DAN FUSI ASIMETRIS .....</b>  | <b>77</b> |
| <b>A. Fusi simetris .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>B. Fusi asimetris .....</b>  | <b>78</b> |
| 1. Iradiasi.....  | 81        |
| 2. Transfer Kromosom yang Dimediasi oleh<br>Microprotoplast.....                            | 82        |
| 3. Inaktivasi sitoplasma.....   | 84        |
| <b>BAB 11 APLIKASI FUSI PROTOPLAS DAN PEMANFAATANNYA DALAM PEMULIAAN TANAMAN.....</b>       | <b>87</b> |
| <b>A. Mengatasi hambatan / inkompatibilitas genetik dalam persilangan konvensional.....</b> | <b>87</b> |
| <b>B. Peningkatan keragaman genetik .....</b>   | <b>88</b> |
| <b>C. Menghasilkan spesies tanaman baru .....</b>   | <b>89</b> |
| <b>D. Ketahanan terhadap hama dan penyakit .....</b>  | <b>90</b> |
| <b>E. Ketahanan terhadap lingkungan abiotik.....</b>  | <b>91</b> |
| <b>F. Mendapatkan tanaman steril jantan/male steril.....</b>                                | <b>91</b> |



|   |     |
|---|-----|
| G. Manipulasi ploidi.....   | 92  |
| H. Produksi batang bawah dalam penyambungan .....   | 94  |
| I. Perbaikan sifat/karakter tanaman .....   | 95  |
| J. Produksi metabolit sekunder .....  | 95  |
| K. Perakitan tanaman dengan penambahan kromosom ( <i>chromosomal additional lines</i> ) ..... | 96  |
| L. Perakitan galur introgresi/substitusi .....  | 98  |
| M. Pemetaan genom .....   | 98  |
| N. Pembuatan hibridoma dalam menghasilkan antibodi .....                                      | 100 |
| O. Sistem transformasi genetik yang stabil untuk analisis fungsional gen .....                | 101 |
| P. Rekayasa genetik pada jamur dan bakteri .....  | 101 |

## **BAB 12 KERAGAMAN GENETIK TANAMAN HASIL**

|  |     |
|--|-----|
| FUSI PROTOPLAS.....                          | 103 |
| A. Variasi karakter morfologi .....          | 103 |
| B. Hilangnya beberapa informasi genetik..... | 104 |
| C. Penggabungan sitoplasma tanaman .....     | 104 |
| D. Terjadinya variasi somaklonal .....       | 105 |
| E. Induksi sterilitas tanaman.....           | 105 |
| F. Induksi poliploidisasi .....              | 105 |
| G. Terjadinya aneuploidi .....               | 106 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>BAB 13 FAKTOR YANG MEMPENGARUHI<br/>KEBERHASILAN FUSI PROTOPLAS .....</b>          | <b>109</b> |
| A. Jenis tanaman.....   | 109        |
| B. Genotip.....   | 110        |
| C. Kekerbatan/jarak genetik.....  | 112        |
| D. Inkompatibilitas tanaman.....  | 112        |
| E. Jaringan sumber protoplas.....   | 113        |
| F. Komposisi dan konsentrasi enzim.....   | 114        |
| G. Konsentrasi PEG dan DMSO yang digunakan  | 114        |
| H. Penggunaan $\text{CaCl}_2$ sebagai larutan<br>pencuci/induksi fusi.....            | 115        |
| I. Kadar keasaman (pH) .....  | 116        |
| J. Temperatur/Suhu inkubasi .....   | 117        |
| K. Metoda fusi protoplas .....  | 117        |
| L. Radiasi ultraviolet.....   | 118        |
| M. Regenerasi Protoplas.....  | 118        |
| N. Kepadatan <i>plating</i> dalam regenerasi protoplas.                               | 119        |
| <b>BAB 14 PROTOKOL FUSI PROTOPLAS PADA TANAMAN<br/>KENTANG DAN GENUS SOLANUM.....</b> | <b>121</b> |
| A. Tanaman Donor.....   | 122        |
| B. Isolasi protoplas .....  | 123        |
| C. Fusi Protoplas Menggunakan Kemofusi .....  | 129        |
| D. Fusi Protoplas Menggunakan Elektrofusi .....                                       | 133        |
| E. Kultur Protoplas dan Regenerasi Tanaman .....                                      | 136        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>BAB 15 PROTOKOL FUSI PROTOPLAS PADA TANAMAN JERUK.....</b>                 | <b>141</b> |
| <b>A. Induksi dan pemeliharaan kalus embriogenik dan kultur suspensi.....</b> | <b>142</b> |
| <b>B. Isolasi protoplas.....</b>  | <b>144</b> |
| <b>C. Purifikasi protoplas.....</b>   | <b>145</b> |
| <b>D. Fusi protoplas (menggunakan metoda PEG)....</b>                         | <b>146</b> |
| <b>E. Kultur protoplas dan regenerasi tanaman .....</b>                       | <b>148</b> |
| <b>F. Validasi hasil fusi protoplas.....</b>                                  | <b>149</b> |
| <b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>   | <b>155</b> |
| <b>RIWAYAT HIDUP .....</b>  | <b>179</b> |

# PENDAHULUAN

Fusi protoplas atau disebut juga dengan hibridisasi somatik merupakan salah satu metoda yang cukup penting dalam program pemuliaan tanaman, yaitu berperan dalam meningkatkan keragaman genetik tanaman. Hal ini dikarenakan melalui metode ini hibridisasi dapat dilakukan tidak saja antar spesies tetapi juga antar genus, yang tidak mungkin atau sangat sulit dilakukan dengan persilangan konvensional. Teknik ini merupakan salah satu metoda modifikasi genetik pada tanaman, yaitu dengan menggabungkan material genetik dua jenis tanaman yang berbeda untuk membuat suatu tanaman hibrida.

Pada awalnya teknik ini ditujukan untuk pengembangan tanaman dengan mengintroduksi karakter yang diinginkan dari tanaman liar ke dalam tanaman komersial yang sulit atau tidak mungkin dilakukan melalui persilangan secara konvensional. Selanjutnya teknik hibridisasi somatik tanaman melalui fusi protoplas ini berkembang menjadi teknik yang cukup penting untuk memanipulasi ploidi tanaman, sehingga memungkinkan untuk dilakukannya kombinasi sel-sel somatik dari tanaman yang berbeda spesies atau genera untuk menghasilkan tanaman dengan kombinasi genetik yang baru.

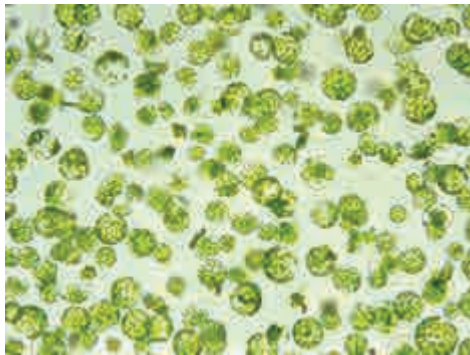
Fusi protoplasma adalah suatu kejadian, yaitu bergabungnya dua atau lebih protoplas baik secara alami/spontan maupun disengaja atau dengan adanya agen yang dapat menginduksi terjadinya fusi. Fusi protoplas dapat juga didefinisikan sebagai suatu usaha untuk menggabungkan protoplasma dari dua macam sel yang berbeda berasal dari tumbuhan tingkat tinggi untuk tujuan tertentu.

Protoplasma adalah sel tumbuhan yang telah dikupas bagian dinding selnya atau sel tumbuhan telanjang tanpa dibungkus oleh dinding sel, sehingga bagian terluar dari sel tersebut adalah membran plasma (**Gambar 1**). Istilah protoplasma pertama kali diperkenalkan oleh Hanstein pada tahun 1880. Protoplasma juga dapat didefinisikan sebagai individual sel yang fungsional dengan membran plasma sebagai lapisan terluar. Individual sel yang fungsional ini berarti seluruh komponen sel, baik itu inti sel dan material sel lainnya yang mengelilingi inti sel, tetap ada dan berfungsi dengan aktif dan hanya dinding dari sel tersebut saja yang hilang.

Sel yang sudah kehilangan dinding selnya akan menghadapi perubahan tekanan osmotik yang sangat drastis dan berbeda dengan lingkungannya semula. Tekanan osmotik yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat merusakkan viabilitas protoplas, namun pada lingkungan dengan tekanan osmotik yang cocok dapat memelihara kestabilan protoplas lebih lama.

Protoplas tidak hanya bisa diisolasi dari sel tanaman saja tetapi juga dari sel bakteri atau jamur (fungi) yang seluruh dinding selnya telah dihilangkan. Pada tanaman, protoplas dapat diisolasi dari semua bagian baik itu akar, batang, daun, umbi, nodul akar, buah, endosperm, maupun sel polen atau serbuk sari serta suspensi sel.

Hibridisasi somatik tanaman melalui fusi protoplasma merupakan suatu metoda yang cukup penting untuk memanipulasi ploidi tanaman, sehingga kita dapat mengkombinasikan dan menggabungkan sel-sel somatik dari kultivar, spesies, atau genus yang berbeda untuk menghasilkan kombinasi genetik yang baru. Teknik fusi protoplas dapat digunakan untuk mencampur sifat genetik dari spesies tanaman yang sama ataupun dari spesies yang berbeda, yang diikuti dengan proses seleksi dari sel hibrida somatik yang diinginkan dan regenerasinya menjadi tanaman hibrid.



**Gambar 1.** Protoplasma tanaman *Arabidopsis* (yang sudah dihilangkan dinding selnya).

**Sumber:** <http://www.dagz.boku.ac.at/pgz/ehemalige-arbeitsgruppen/ag-pitzschke/>

---

Fusi protoplas dapat digunakan untuk mengatasi masalah dalam persilangan secara seksual, yaitu tanaman yang sulit atau tidak mungkin untuk disilangkan secara konvensional. Terutama pada tanaman yang mengalami inkompatibilitas seksual dan sterilitas (baik steril jantan maupun steril betina) ataupun tanaman dengan siklus hidup yang panjang (Grosser *and* Gmitter 1990; Grosser et al. 1996).



Fusi protoplas dapat dilakukan untuk mentransfer beberapa gen yang berguna seperti gen ketahanan terhadap penyakit, fiksasi nitrogen, tingkat pertumbuhan yang cepat, pembentukan produk tertentu yang lebih banyak, kualitas protein, toleran terhadap suhu dingin, toleran terhadap kekeringan, resistensi terhadap herbisida dari satu spesies ke spesies lainnya. Teknik ini dapat dilakukan untuk perbaikan suatu spesies karena dapat menghasilkan rekombinasi genetik. Fusi protoplas digunakan untuk menggabungkan gen dari berbagai organisme untuk menciptakan strain baru dengan sifat yang diinginkan. Teknik ini tidak hanya bisa diterapkan untuk tanaman tetapi juga pada jamur, atau dalam rekayasa strain mikroba untuk industri bioproses tertentu.

# SEJARAH PERKEMBANGAN FUSI PROTOPLAS

Terdapat beberapa catatan sejarah tentang mengenai keberhasilan isolasi protoplas dari sel tanaman. Protoplas pertama kali diisolasi secara mekanik oleh J. Klercker (1892), dari sel yang mengalami plasmolisis. Pada tahun 1927 E. Kiister, berhasil mengisolasi protoplas dari beberapa tanaman seperti *Solatum nigrum*, *Lycopersicon esculentum* dll. Dinding sel dihidrolisis selama proses pematangan buah sehingga protoplas dapat dikeluarkan dari sel. Selanjutnya R. Chambers and K. Hoffer (1931), berhasil mengisolasi beberapa protoplas dari potongan tipis jaringan epidermis umbi dari bawang merah dalam larutan 1M sukrosa, sehingga protoplas mengerut dari dinding sel dan dapat dikeluarkan dengan pisau. Isolasi protoplas sampai saat itu belum untuk dikulturkan, tidak ada informasi yang menyatakan bahwa protoplas yang didapatkan dapat dikulturkan.

Isolasi protoplas secara enzimatik pertama kali dilakukan oleh Edward C. Cocking pada tahun 1960 (**Gambar 2**). Protoplas dalam jumlah yang banyak berhasil diisolasi dari ujung akar tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum*) dengan menggunakan larutan konsentrat



**Gambar 2.** E.C. Cocking; Cocking adalah seorang pioneer dalam isolasi protoplas secara enzimatik dan kultur protoplas dari sel hidup.

**Sumber:** <http://users.ugent.be/~pdebergh/his/his11az1.htm>

---

dari enzim sellulase, yang dihasilkan dari jamur *Myrothecium verrucaria*, untuk mendegradasi dinding sel tanaman. Berhasilnya proses isolasi protoplas yang pertama oleh Cocking (1960), mengawali memungkinkannya dilakukan teknik fusi protoplas tanaman.

Pada tahun 1968 I. Takebe, Y. Otsuki dan S. Aoki, memproduksi enzim sellulase and macerozyme secara komersial dan digunakan secara bertahap untuk mengisolasi protoplas dari sel-sel mesofil tanaman tembakau (melalui dua tahapan isolasi). Jaringan mesofil daun tersebut dimaserasi dengan menggunakan macerozyme untuk mendapatkan sel tunggal sebagai tahapan pertama, diikuti oleh degradasi dinding sel dengan sellulase untuk tahapan berikutnya.

Pada saat yang sama pada tahun 1968, J. B. Power and E. C. Cocking, pertama kali mendemonstrasikan bahwa campuran dari kedua enzim (sellulase + macerozyme) dapat digunakan secara simultan (melalui satu tahapan) untuk mengisolasi protoplas sel tanaman. Keberhasilan isolasi protoplas secara enzimatis ini meninggalkan metode isolasi protoplas secara mekanik yang jauh dari efektif.

Keberhasilan regenerasi tanaman dari protoplas pertama kali dilaporkan oleh I. Takebe, G. Labib, G. Melchers pada tahun 1971, yang diisolasi dari tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*). Takebe beserta rekannya tersebut sukses meregenerasikan protoplas menjadi tanaman utuh.

Fusi protoplas pertama kali dideskripsikan lebih dari seabad yang lalu oleh Küster pada publikasi beliau pada tahun 1909 (Shankar et al. 2013). Sedangkan, pertama kali keberhasilan dalam fusi protoplas dilaporkan terjadi lebih dari empat dekade yang lalu, yaitu pada tahun 1972 oleh P. S. Carlson, H. H. Smith, R. D. Dearing. Hibridisasi somatik tersebut dilakukan pada tanaman tingkat tinggi

yaitu antara dua spesies *Nicotiana* yang inkompatibel secara seksual (*N. glauca* + *N. langsdorffi*), menggunakan protoplas dari jaringan mesofil dari daun.

Pada saat itu, teknik ini hanya dianggap sebagai suatu metode hibridisasi antar spesies untuk tanaman yang inkompatibel. Belakangan, ketertarikan terhadap teknik fusi protoplas ini juga dikarenakan hibrida asimetris yang dihasilkan, yaitu jumlah gen dari salah satu tetua lebih sedikit dari pada jumlah gen dari tetua lainnya.

Sejak keberhasilan Carlson dkk, ratusan publikasi melaporkan hasil-hasil penelitian hibridisasi somatik ini, baik yang berhubungan dengan perbaikan metoda fusi tanaman ataupun evaluasi terhadap potensi hibridisasi somatik pada tanaman-tanaman yang berbeda termasuk, jeruk, padi, rapeseed, tomat dan kentang.

Pada tanaman buah-buahan, teknik fusi protoplas ini menuai sukses yang besar pada tanaman jeruk, yaitu melalui fusi protoplas yang berasal dari suspensi sel-sel embriogenik dengan protoplas yang berasal dari sel-sel daun. Teknik ini berhasil meregenerasikan tanaman jeruk hibrida dari sekitar 500 kombinasi tetua yang berbeda.

Saat ini, perkembangan teknik fusi protoplas tidak semaju perkembangan teknik biologi molekular tanaman yang mengambil alih perkembangan penelitian ilmu pemuliaan tanaman, melalui proses transformasi genetik. Dalam ilmu rekayasa genetika tanaman, perbaikan karakter tanaman hanya melibatkan beberapa gen spesifik yang dibutuhkan saja, sedangkan hibridisasi somatik melalui teknik fusi protoplas, gen yang terlibat sangat banyak meliputi sebagian genom, baik gen yang membawa karakter yang diinginkan ataupun yang tidak diinginkan. Faktor lain yang juga membuat teknik fusi protoplas tidak terlalu pesat berkembang untuk saat ini adalah dikarenakan belum mantapnya teknik regenerasi protoplas menjadi

tanaman pada banyak spesies-spesies tanaman penting. Produk-produk hasil fusi protoplas yang dilaporkan di publikasi-publikasi ilmiah yang dilakukan oleh peneliti-peneliti di tingkat laboratorium sebagian besar tidak terintegrasi secara langsung di dalam program-program pemuliaan tanaman, sehingga hibridisasi somatik sebagian besar berkembang hanya sebatas sebagai ketrampilan akademik saja.

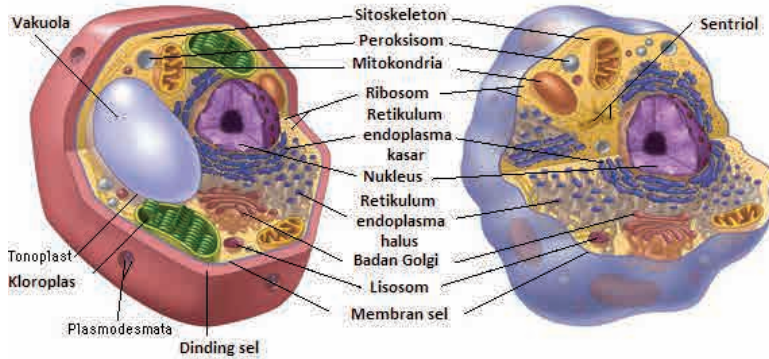


# ISOLASI PROTOPLAS

Karakteristik sel tumbuhan adalah terdapatnya dinding sel yang tebal dan kaku mengelilingi dan melindungi membran plasma serta bagian dalam dari sel hidup. Apabila sel telah kehilangan dinding selnya, maka satu-satunya pembatas antara lingkungan luar dengan bagian dalam dari sel yang hidup adalah membran plasma atau plasmalemma. Keberadaan dinding sel inilah yang membedakan antara sel tumbuhan dan sel hewan, dimana pada sel hewan tidak terdapat dinding sel dan bagian terluar dari selnya adalah membran plasma (**Gambar 3**). Membran plasma adalah suatu selaput yang terdiri dari protein, lemak dan oligosakarida.

Sel tumbuhan yang telah dikupas bagian dinding selnya sehingga bagian terluar dari sel tersebut adalah membran plasma, disebut protoplasma. Menurut Torrey dan Landgren (1977) “isolasi protoplas adalah pemisahan protoplas dari dinding selnya”. Vasil (1980) mendefinisikan bahwa “protoplas adalah bagian dari sel tumbuhan yang terletak di dalam dinding sel dan dapat diplasmolisis dan diisolasi dengan menghilangkan dinding selnya baik dengan cara





**Gambar 3**

Perbedaan sel tumbuhan (kiri) dan sel hewan (kanan). Bagian terluar dari sel tumbuhan adalah dinding sel, sedangkan pada sel hewan bagian terluarnya adalah membran plasma atau membran sel.

**Sumber:** <http://www.phschool.com/science/biology/place/biocoach/cells/review.html> yang dimodifikasi.

mekanis atau enzimatis”. Oleh karena itu, protoplas yang sudah diisolasi adalah sel tanaman telanjang yang dikelilingi oleh membran plasma dan berpotensi mampu untuk meregenerasikan kembali dinding selnya, dan mengalami pembelahan sel, pertumbuhan dan regenerasi tanaman dalam kultur invitro.

Sumber eksplan dalam isolasi dari protoplasma dapat berasal dari organ akar, daun, buah, umbi, nodul akar, endosperm, kalus dan kultur suspensi sel. Jaringan mesofil bunga karang (*spongy*) dan jaringan tiang (*palisade*) dari daun juga sering digunakan dalam isolasi protoplas tanaman tembakau dan petunia. Protoplasma juga bisa diisolasi dari anther dari tanaman *Pelargonium* (Abo El-Nil dan Hilderbrandt, 1971); kalus dari tanaman *Gossypium hirsutum* (Bhojwani et al. 1977).

Pada dasarnya protoplas dapat diisolasi dari berbagai jaringan tanaman yang ditumbuhkan secara *invivo* atau *invitro*. Jaringan tanaman yang digunakan untuk isolasi protoplasma umumnya berupa jaringan yang muda, yaitu berasal dari tanaman yang mempunyai umur fisiologis muda, seperti pucuk muda (seperti dari kecambah, bibit, plantlet), pucuk adventif hasil pangkasan. Isolasi protoplasma dari sel jaringan muda tersebut lebih mudah dikarena dinding selnya masih sederhana dan hanya terdiri dari dinding sel primer saja dan jaringannya masih memiliki sel-sel parenchyma, dinding selnya belum berlignin, sehingga belum terlalu kompleks. Walaupun demikian, pada keadaan tertentu sumber protoplas juga bisa didapatkan dari jaringan yang telah dewasa, namun media yang digunakan untuk isolasi protoplasma akan lebih kompleks lagi karena dinding selnya telah berlignin, telah memiliki dinding sel primer dan dinding sel sekunder.

Sumber protoplas yang paling sering dan paling baik digunakan adalah dari sel-sel mesofil jaringan daun, atau sel yang berasal dari kultur suspensi cair. Kuantitas dan kualitas protoplas yang dihasilkan juga dipengaruhi oleh kondisi tumbuh tanaman donor, seperti umur tanaman donor, intensitas cahaya, photoperiodisitas, kelembaban, penyiraman (kecukupan air dari tanaman), suhu dan nutrisi. Kultur suspensi sel merupakan sumber yang paling baik dalam menghasilkan protoplas dengan kualitas yang baik dan konsisten.

Untuk mendapatkan protoplasma dari sel tumbuhan dapat dilakukan dengan menghilangkan atau membuang dinding sel tumbuhan. Teknik ini dikenal dengan istilah isolasi protoplas. Tahapan yang paling penting dalam isolasi protoplas adalah menghilangkan dinding sel tanaman tanpa merusak protoplasma dari sel tersebut. Dinding sel yang harus dihilangkan pada isolasi protoplas umumnya terdiri dari suatu senyawa yang kompleks. Penghilangan dinding sel harus

diikuti dengan terbebasnya protoplas dalam jumlah yang cukup banyak. Protoplas dapat diisolasi dari jaringan baik secara mekanik maupun secara kimia.

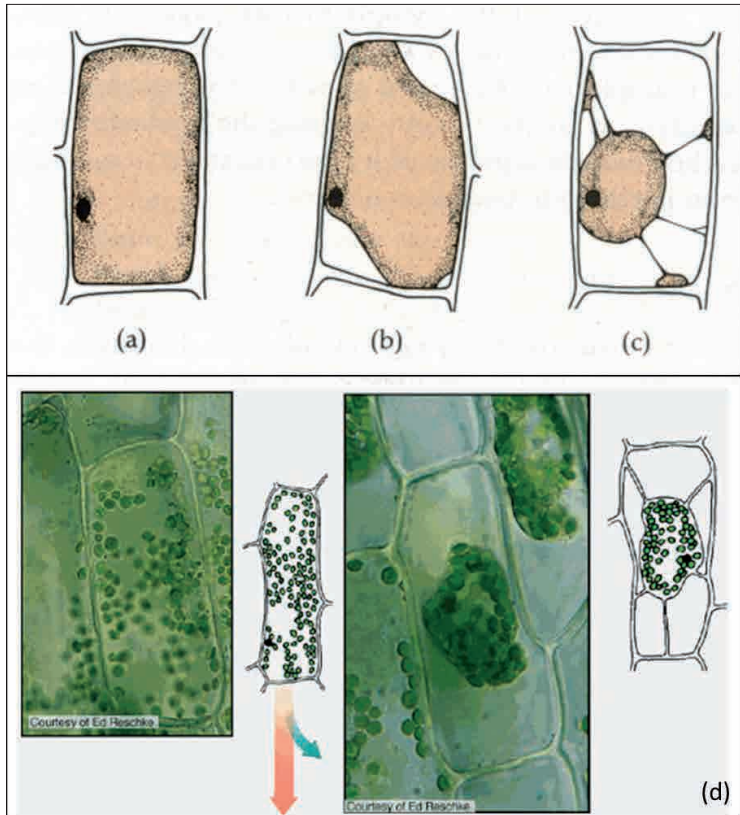
## A. METODE MEKANIK

Isolasi protoplas secara mekanik diperkenalkan lebih dari 100 tahun yang lalu yang merupakan teknik isolasi protoplas pertama, dilakukan oleh Klerker pada tahun 1892 dan oleh Kuster pada tahun 1920.

Prinsip dasar dari metode mekanik ini adalah memotong jaringan tanaman yang plasmolisis karena adanya induksi osmotik untuk mengambil protoplas dari sel tanaman (**Gambar 4**). Pengambilan protoplas dilakukan dengan memotong dinding sel dengan menggunakan alat bedah mikro seperti pisau scalpel yang tajam di bawah mikroskop sehingga protoplas lepas dari dinding sel (**Gambar 5**).

Fusi pertama yang berhasil dengan metode isolasi protoplas secara mekanik ini terjadi pada tahun 1909. Metode ini berhasil mengisolasi protoplasma dari daun *Saintpaulia ionantha* dan dikulturkan hingga tumbuh kalus.

Kelemahan dan metode mekanik ini adalah jumlah protoplas yang didapat sangat terbatas. Protoplas yang diperoleh sangat sedikit tetapi membutuhkan waktu dan usaha yang besar. Prosedur ini juga hanya bisa diterapkan pada jaringan-jaringan tanaman tertentu saja. Beberapa aplikasi penerapan metode isolasi protoplasma secara mekanik ini dilakukan untuk mengisolasi protoplas dari jaringan daun tanaman, umbi, epidermis buah, akar lobak. Viabilitas protoplasma rendah, karena sering terjadi kerusakan protoplasma selama proses pengupasan dinding sel.

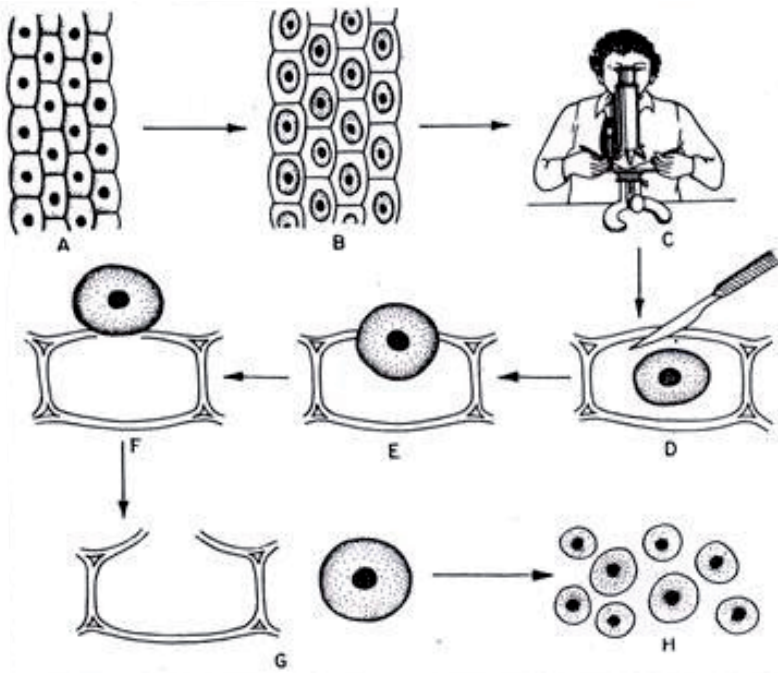


**Gambar 4**

Tahapan plasmolisis sel: A. sel yang normal; B. Protoplasma sel yang mengkerut karena adanya proses plasmolisi; C. Plasmolisi sempurna; D. Pengamatan plasmolisis pada sel daun dibawah mikroskop (kiri: sel yang normal; kanan: sel yang mengalami plasmolisis)

**sumber:** <http://bio100.class.uic.edu;>

<http://goose.ycp.edu/~kkleiner/fieldnaturalhistory/fnhimages/Cells/plasmolysisa.jpg>



**Gambar 5**

Ilustrasi isolasi protoplas secara mekanik. A. Jaringan tanaman; B. Sel yang mengalami plasmolisis; C-D. Pematangan dinding sel dengan menggunakan pisau scalpel yang tajam di bawah mikroskop; E-F. Lepasnya protoplas dari dinding sel; G. Sel yang kosong karena protoplas telah diisolasi; H. Protoplas yang telah diisolasi

**sumber:** <http://www.biologydiscussion.com/plants/plant-protoplast/plant-protoplast-culture-meaning-history-and-principles/14773>)

Isolasi protoplas secara mekanik pada skala yang agak besar dilakukan dengan merusak jaringan sel tanaman (yang telah mengalami plasmolisis sempurna) menggunakan sikat baja (*stainless steel*) yang sangat halus. Teknik ini dapat menghasilkan protoplas dengan usaha yang lebih ringan dibandingkan dengan melepaskan protoplas satu persatu menggunakan pisau *scalpel*, tetapi persentase protoplas utuh yang dihasilkan sangat kecil, karena sebagian besar protoplas mengalami kerusakan.

Sel tumbuhan merupakan sistem osmotik. Dinding sel memberikan tekanan kedalam pada protoplas. Demikian juga, protoplas memberikan tekanan yang sama dan berlawanan pada dinding sel. Dengan demikian, kedua tekanan menjadi seimbang. Jika dinding sel dihilangkan, tekanan yang seimbang tersebut akan terganggu. Akibatnya, tekanan keluar dari protoplas akan lebih besar dalam keadaan tanpa dinding sel, dikarenakan protoplas menjadi membesar dengan adanya aliran air dari media eksternal yang masuk ke dalam protoplas. Tekanan keluar yang besar tersebut dapat menyebabkan pecahnya protoplas (Maheswari et al, 1986). Hal ini mengakibatkan protoplas yang baru diisolasi memiliki struktur osmotik rapuh. Oleh karena itu, pada saat dinding sel akan dihilangkan untuk mengisolasi protoplas, sel atau jaringan tersebut harus ditempatkan dalam larutan hipertonik yang terbuat dari larutan gula seperti sorbitol atau mannitol pada konsentrasi yang lebih tinggi (13%) untuk plasmolisis dari dinding sel.

Diantara kedua gula tersebut, manitol dianggap lebih baik sehingga lebih sering digunakan karena gula ini tidak dimetabolisme oleh sel tanaman. Manitol adalah sebuah gula alkohol yang mudah ditransport melewati plasmodesmata, menyediakan lingkungan osmotik yang stabil untuk protoplas dan mencegah perluasan dan

pecahnya protoplas, walaupun setelah kehilangan dinding sel. Oleh sebab itu, larutan hipertonik ini dikenal sebagai stabilizer osmotik atau plasmolyticum atau osmolyticum.

## B. METODE KIMIA

Pada tahun 1960, Edward C. Cocking pertama kali menggunakan metode isolasi protoplas dengan reaksi enzimatik. Prinsip dari metode isolasi protoplas secara enzimatik adalah digesti dinding sel tanaman dengan menggunakan enzim. Secara umum, enzim yang digunakan untuk menghancurkan dinding sel tumbuhan umumnya ada 3 yaitu: Cellulase untuk menghancurkan selulosa, Hemicellulase untuk menghancurkan hemiselulosa dan pectinase untuk menghancurkan pektin (Vasil dan Vasil, 1980).

Pada tahun 1968 enzim yang dapat mendegradasi dinding sel mulai dikomersialisasi. Enzim *selulase Orozuka RS*, *selulase R-10*, *Macerozyme R-10*, *Pectolyase Y-23*, *Driselase* adalah beberapa enzim pendegradasi dinding sel yang efektif yang tersedia secara komersial sampai saat ini. Beberapa enzim yang sering digunakan beserta sumber organisme penghasil enzim disajikan pada **Tabel 1**.

Isolasi protoplas secara enzimatik ini dapat dilakukan menggunakan segala jenis sel, yaitu dari dari kotiledon, hipokotil, dan daun tanaman baik yang berasal dari tanaman yang secara *in vivo* atau *in vitro*. Namun jaringan daun yang berasal dari tunas yang ditumbuhkan secara *in vitro* adalah sumber protoplas yang paling baik. Hal ini dikarenakan sumber jaringan yang digunakan sudah steril sehingga tidak diperlukan tahapan sterilisasi sebelum isolasi protoplas dilakukan.

Protoplasma yang telah berhasil diisolasi secara enzimatik berasal dari berbagai organ tanaman seperti: daun, tangkai daun, pucuk, akar, buah, koleoptil, embrio dan mikrospora (Vasil dan vasil 1980; Erikson, 1985). Diantara organ tersebut sel yang paling mudah dan bagus untuk diisolasi protoplasmanya adalah berasal dari jaringan mesofil daun, karena bentuk selnya relatif seragam, tidak perlu merusak tanamannya, serta dinding sel mudah terkelupas oleh enzim.

**Tabel 1.** Enzim komersial yang sering digunakan untuk isolasi protoplas secara kimiawi, nama komersial beserta sumber organisme penghasil enzim

| <b>Enzim</b>                              | <b>Sumber Organisme</b>                           |
|---|---|
| <b>A. Enzim pendegradasi selulosa</b>     |   |
| Cellulysin (Onozuka R10)                  | <i>Trichoderma reesei</i><br>( <i>T. viride</i> ) |
| Driselase                                 | <i>Irpez lactes</i>                               |
| <b>B. Enzim pendegradasi hemiselulosa</b> |   |
| Hemicellulase                             | <i>Aspergillus niger</i>                          |
| Rhozyme HP 150                            | <i>Aspergillus niger</i>                          |
| <b>C. Enzim pendegradasi pektin</b>       |   |
| Pectinase                                 | <i>Aspergillus niger</i>                          |
| Macerase (Macerozyme)                     | <i>Rhizopus spp.</i>                              |
| Pectinol AC, Pectolyase Y23               | <i>Aspergillus niger</i>                          |
| Pectic-acid acetyl transferase (PATE)     | <i>Aspergillus japonicus</i>                      |



Campuran dan konsentrasi enzim yang digunakan untuk isolasi protoplasma beragam jenis dan konsentrasinya tergantung jenis jaringan yang digunakan sebagai eksplan, kondisi fisiologis eksplan, terutama umur jaringan yang erat kaitannya dengan komposisi dinding selnya. Beberapa contoh enzim yang dapat digunakan pada jaringan yang berbeda (Purwito, 1999) seperti:

a. *Enzim untuk jaringan Akar*

- 1) 2 % rhozyme
- 2) 2 % meicellase
- 3) 0,03 % macerozyme R10

b. *Enzim untuk daun Serealia*

- 1) 2 % cellulysin
- 2) 0,2 % macerozyme R10
- 3) 0,5 % hemicellulase
- 4) 11 % mannitol

c. *Enzim untuk Daun Tembakau:*

- 1) 0,5 % Onozuka R10 cellulase
- 2) 0,1 % Onozuka R10 macerozyme R10
- 3) 13,0 Mannitol

Isolasi protoplas dari organisme yang berbeda memerlukan enzim yang berbeda, artinya efektifitas enzim bervariasi tergantung dari organisme sebagai sumber dari sel tersebut. Sebagai contoh, dinding sel bakteri dapat didegradasi dengan menggunakan lisozim, dinding sel jamur dapat didegradasi dengan Novozyme-234, termasuk glucanase dan chitinase atau enzim lainnya. Dinding sel *Streptomyces* didegradasi dengan menggunakan lysozyme dan achromopeptidase (Narayanswamy, 1994; Jogdand 2001). Keberhasilan dari isolasi protoplas sangat bergantung kepada kondisi dari jaringan tanaman dan kombinasi dari enzim yang digunakan.

Selain jenis enzim, lama perlakuan enzim dan konsentrasi yang digunakan juga merupakan faktor penting yang mempengaruhi keberhasilan isolasi protoplas secara kimiawi ini. Kedua faktor tersebut harus distandarisasi terlebih dahulu untuk jaringan-jaringan tanaman tertentu.

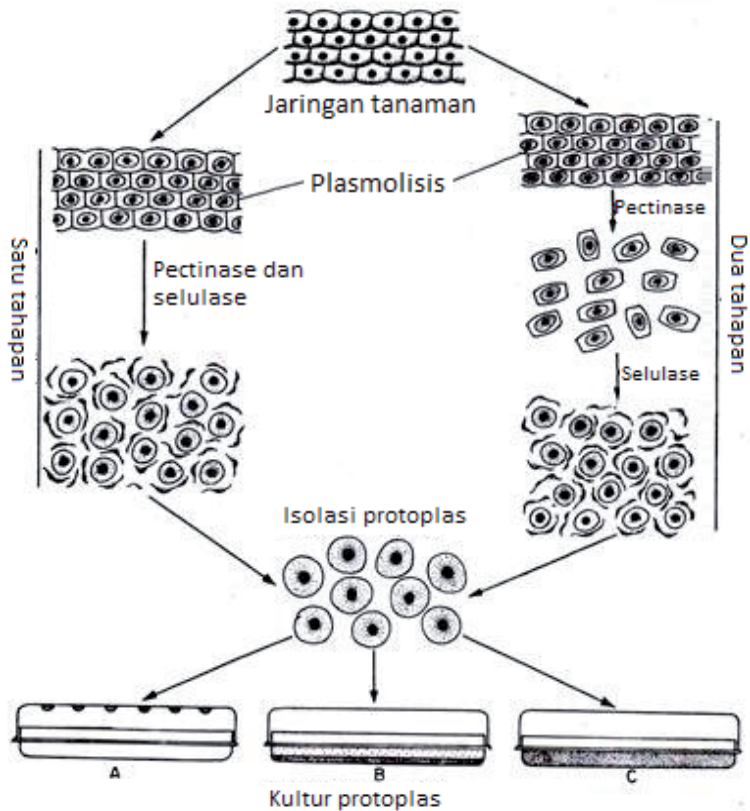
Ada dua jenis metode isolasi protoplasma secara enzimatik yang umum diterapkan (Evans dan Cocking, 1977; Bajaj, 1977). Kedua metode ini memiliki kelebihan dan kekurangan tertentu.

#### ***Metode Satu Langkah (Metode Langsung/Campuran):***

Pada metode isolasi dengan satu tahapan, enzim yang digunakan merupakan campuran, yaitu selulase dan pektinase atau macerozyme dicampur dan diaplikasikan pada jaringan tanaman, sehingga seluruh dinding sel dipecah dan didegradasi atau dihilangkan dalam satu tahapan

#### ***Metode Dua Langkah (Metode Sekuensial):***

Metode isolasi protoplas secara enzimatik melalui dua tahapan, dimulai dengan menginkubasi jaringan tanaman utuh dengan larutan pektinase atau macerozyme yang akan mendegradasi lamella tengah antar sel-sel sehingga akan memisahkan sel-sel tersebut. Setelah sel-sel terpisah, kemudian sel dicuci dalam larutan CPW (**Tabel 2**) bebas dari enzim tetapi mengandung plasmolyticum dan disentrifugasi dengan kecepatan rendah (100g). Pelet diambil dan diresuspensi kedalam larutan enzim kedua yang mengandung selulase dan hemiselulase, yang akan mendegradasi dan membuang lapisan selulosa dan hemiselulosa dari dinding sel. Dalam proses ini perlakuan enzim diberikan secara berurutan (**Gambar 6**).



### Gambar 6

Teknik isolasi protoplas secara kimiawi menggunakan beberapa larutan enzimatis.

**Sumber:** <http://biologydiscussion.com/plants/plant-protoplast/plant-protoplast-culture-meaning-history-and-principles/14773>

**Tabel 2.** Komposisi larutan CPW (Cocking, Peberdy and White)

| Bahan Kimia                               | Jumlah (mg) |
|---|-------------|
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                  | 25,2        |
| $\text{KNO}_3$                            | 101         |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 1480        |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 246         |
| KI  | 0,16        |
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,025       |

Untuk 1 liter larutan pH 5,8

**Catatan:** Modifikasi komposisi dan konsentrasi larutan CPW juga dilakukan pada beberapa prosedur isolasi protoplas (Kuzminsky et al. 2016)

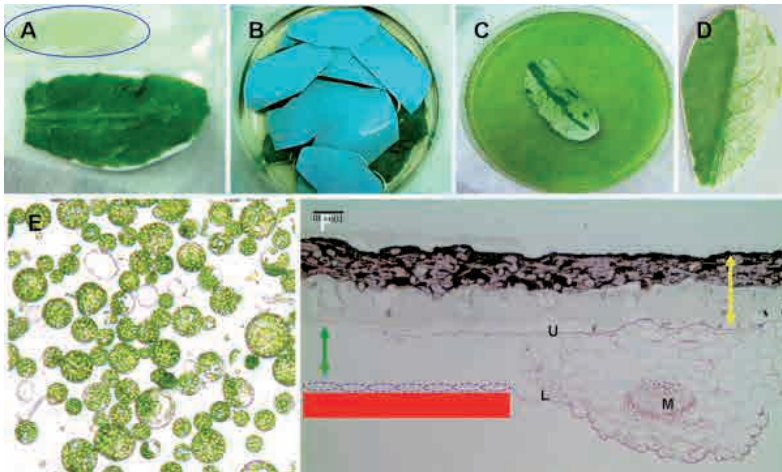
Secara teknis, bagian tanaman yang akan digunakan sebagai sumber eksplan harus disterilkan terlebih dahulu apabila sumber eksplan berasal dari tanaman yang tumbuh secara *invivo*. Sterilisasi dapat dilakukan dengan cara mencuci menggunakan larutan desinfektan. Sterilisasi dilakukan menggunakan larutan sodium hypoklorit 1 -2 % selama 10 - 30 menit tergantung jenis eksplan yang digunakan. Setelah dicuci bersih menggunakan air steril beberapa kali (3-4 kali) untuk menghilangkan sisa sodium hipoklorit pada eksplan, selanjutnya isolasi protoplasma dapat dilakukan.

Untuk lebih memudahkan isolasi protoplasma dan mengefektifkan kerja enzim, jaringan tanaman yang sudah steril dihilangkan urat daunnya dengan menggunakan mata skalpel runcing dan steril, dikupas jaringan epidermis dan eksplan diiris halus.

Untuk mengurangi daya tarik menarik (adhesi) antara sitoplasma dengan dinding selnya, Larutan enzim biasanya ditambahkan senyawa osmotikum. Senyawa osmotikum yang dapat digunakan antara lain: Mannitol, Sorbitol, Glukosa, Fruktosa, Galaktosa, Sukrosa. Setelah dinding sel lepas, selanjutnya eksplan direndam ke dalam larutan media preplasmolisis (dapat berlangsung selama 1-8 jam, tergantung kepada jenis eksplan yang digunakan).

Media yang digunakan untuk preplasmolisis tergantung pada jenis eksplan. Eksplan yang berbeda biasanya menggunakan larutan preplasmolisis yang berbeda, misalnya untuk tembakau medium preplasmolisis tersusun atas medium isolasi protoplasma ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  1480,0 mg  $\text{L}^{-1}$  dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  27,2 mg  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{KNO}_3$  101,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  246,0 mg  $\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,025 mg  $\text{L}^{-1}$ , KI 0,16 mg  $\text{L}^{-1}$ , pH 5,8) ditambah 13% mannitol. Setelah tahapan preplasmolisis, baru dilakukan isolasi protoplas secara enzimatik dengan menggunakan media isolasi protoplas. Eksplan dipindah ke dalam tabung steril dan dituangi medium enzim sebanyak 10 ml, lalu tabung ditutup dengan aluminium foil steril dan diisolasi menggunakan parafilm atau plastik wrap. Tabung selanjutnya di shaker pada kecepatan 40 rpm selama semalam atau 4-16 jam.

Belakangan ini juga dikembangkan metode isolasi protoplas menggunakan metode enzimatik yang dikombinasikan dengan penggunaan pita perekat (tape) (**Gambar 7**). Teknik ini diaplikasikan untuk mengisolasi protoplas dari sel-sel mesofil tanaman Arabidopsis (Wu et al., 2009).



**Gambar 7**

Menggunakan *Tape-Arabidopsis Sandwich* untuk isolasi protoplas pada tanaman *Arabidopsis* (Wu et al. 2009). (A) Epidermis atas menempel pada “*Time tape*” (pita perekat) dan epidermis bawah ditempel dengan “*3M Magic tape*” untuk dibuang. Lapisan epidermis bawah dibuang dengan mengupas *tape* 3 M; lingkaran biru menunjukkan sel dari epidermis bawah pada pita 3 M setelah dikupas. (B) Daun dengan “*Time tape*” yang masih menempel pada permukaan atas daun (“*Time tape*” yang berwarna biru), diinkubasi dalam larutan enzim. (C) Setelah 1 jam, dinding sel didigesti (dihancurkan) dan protoplas terlepas ke bagian bawah petri. (D) Enzim hanya menghancurkan dinding sel sel-sel mesofil yang tidak dilindungi oleh sel-sel epidermis bawah. Kiri: utuh; kanan sel epidermis bawah yang sudah dibuang. (E) Protoplas yang berasal dari daun *Arabidopsis*. (F) Setelah inkubasi dalam larutan enzim, semua sel mesofil menjadi protoplas: Pengamatan dibawah mikroskop menunjukkan bahwa hanya sel-sel epidermis atas yang masih ada. Panah kuning: “*Time-tape*”; garis merah: posisi relatif

dari 3 M “*Magic Tape*” di mana lapisan sel epidermis bawah (lingkaran ungu) dibuang; panah hijau; posisi jaringan mesofil. M: pelepah; U: epidermis atas; L: epidermis bawah. Bar = 100 m.

Penggunaan pita perekat dilakukan untuk membuang sel epidermis bawah, sedangkan pita perekat yang lain ditempel pada sel epidermis atas. Setelah sel epidermis bawah dihilangkan, sel mesofil yang sebelumnya berada dibagian atas sel epidermis bawah menjadi berada dibagian luar sehingga memungkinkan enzim untuk langsung bersentuhan dengan sel mesofil, dan protoplas yang dihasilkan hanya didapatkan dari sel mesofil saja.

# PEMURNIAN DAN PENGUJIAN VIABILITAS PROTOPLAS

## A. PEMURNIAN PROTOPLASMA

Protoplasma yang telah diisolasi harus dimurnikan terlebih dahulu untuk memisahkan protoplas dari jaringan/debris atau kotoran yang tidak diperlukan. Pemurnian protoplasma dapat dilakukan dengan filtrasi/ penyaringan, sedimentasi dan pencucian, floatasi (pengapungan protoplas), dan metoda densitas buffer.

### 1. Filtrasi

Filtrasi merupakan tahapan yang bertujuan untuk membuang debris atau kotoran dari larutan suspensi protoplas. Debris, jaringan atau material selain protoplas yang tidak diinginkan, dipisahkan dengan menyaring protoplas menggunakan filter steril atau saringan nylon berukuran mesh 50-100  $\mu\text{m}$ . Melalui penyaringan ini diharapkan hanya protoplasma sel yang bisa melewati saringan tersebut, sehingga akhirnya protoplas akan terpisah dari jaringan lain.



## 2. Sedimentasi dan pencucian

Sedimentasi dan pencucian dilakukan untuk menghilangkan enzim-enzim yang digunakan sebelumnya dalam proses isolasi protoplas. Enzim dihilangkan dengan men-sentrifugasi suspensi protoplas pada kecepatan 600 rpm selama 5 menit. Protoplas akan mengendap di bagian bawah tabung sementara supernatan yang berisi larutan enzim akan dihilangkan/dibuang dengan bantuan pipet. Protoplas disuspensi kembali dalam media pencuci yang mengandung larutan osmotikum atau dapat juga dicuci dengan larutan osmotikum dengan tambahan media nutrisi atau kalsium klorida yang terhidrasi. Suspensi disentrifugasi untuk mengendapkan protoplas kembali dan media pencucian/supernatan dibuang. Sisa-sisa enzim dihilangkan dengan mencuci protoplas dua atau tiga kali dengan medium pencuci.

## 3. Floatasi (pemisahan protoplas dengan pengapungan)

Dalam metode ini protoplas utuh dipisahkan dari protoplas yang rusak atau pecah dengan mensuspensikan protoplas dalam larutan sukrosa 20-40% dan disentrifugasi pada kecepatan 350rpm selama tiga menit. Protoplas utuh akan terkumpul di bagian atas larutan sukrosa, dan dapat diambil dengan menggunakan pipet. Selain larutan sukrosa larutan pengapung dapat juga menggunakan Ficoll (Schenk dan Hildebrandt 1969).

Metode lain yang juga dapat dilakukan untuk floatasi protoplas adalah dengan menggunakan medium pengapung (medium floatasi) yang ditambahkan medium pencuci. Pelet yang mengandung protoplas diresuspensi kedalam larutan pengapung dan pencuci kemudian disentrifugasi. Protoplasma akan melayang-layang diantara medium pengapung dan medium pencuci.

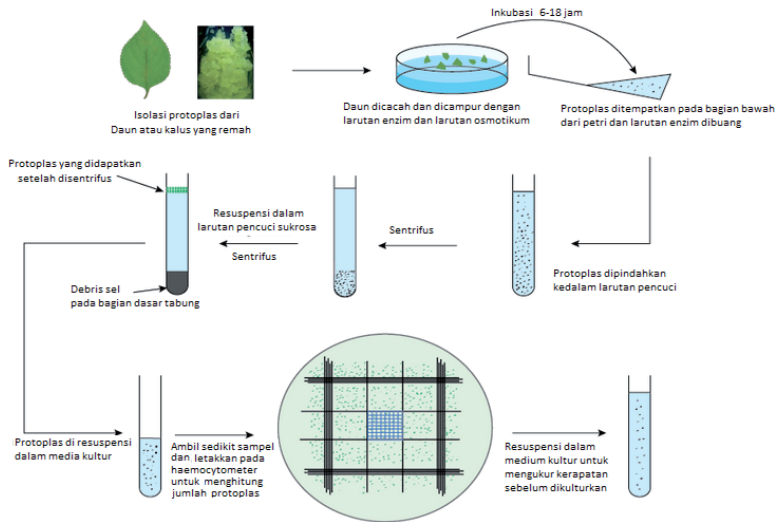
Protoplasma yang melayang-layang dipindahkan ke dalam tabung baru dan ditambah 10 ml medium pencuci, dan disentrifuge kembali, maka protoplasma akan mengendap sebagai pelet. Selanjutnya supernatan dibuang dan pelet ditambah medium pencuci, dan disentrifuge, kemudian supernatan dibuang dan didapatkan suspensi protoplasma yang sudah murni.

#### **4. Metoda densitas buffer**

Metoda densitas buffer ini digunakan untuk pemurnian protoplas dan dikembangkan oleh Larkin (1976). Dalam metode ini 0,5- 3,0 volume preparasi protoplas kasar disaring menggunakan kain muslin steril dilapisi LymphoPrep (LymphoPrep™). Setelah penyaringan, larutan tersebut merupakan larutan yang sudah steril. Larutan dimasukkan ke dalam tabung untuk di sentrifugasi pada kecepatan 50-200 g selama sekitar 10 menit. Protoplas akan terkumpul sebagai cincin antara larutan enzim dan LymphoPrep dan serpihan atau kotoran akan mengendap di bagian bawah dari larutan.

## **B. MENGHITUNG KERAPATAN PROTOPLASMA**

Setelah proses pemurnian, protoplas yang didapatkan dihitung kerapatannya sebelum dikulturkan atau proses fusi dilakukan (**Gambar 8**). Kerapatan suspensi protoplasma yang dikulturkan untuk setiap spesies tanaman berbeda-beda, seperti pada tanaman tembakau kerapatan suspensi protoplasnya berkisar 50.000 sel/ ml, sedangkan pada tanaman petunia terdapat protoplasma.sekitar 25000 sel/ ml.

**Gambar 8**

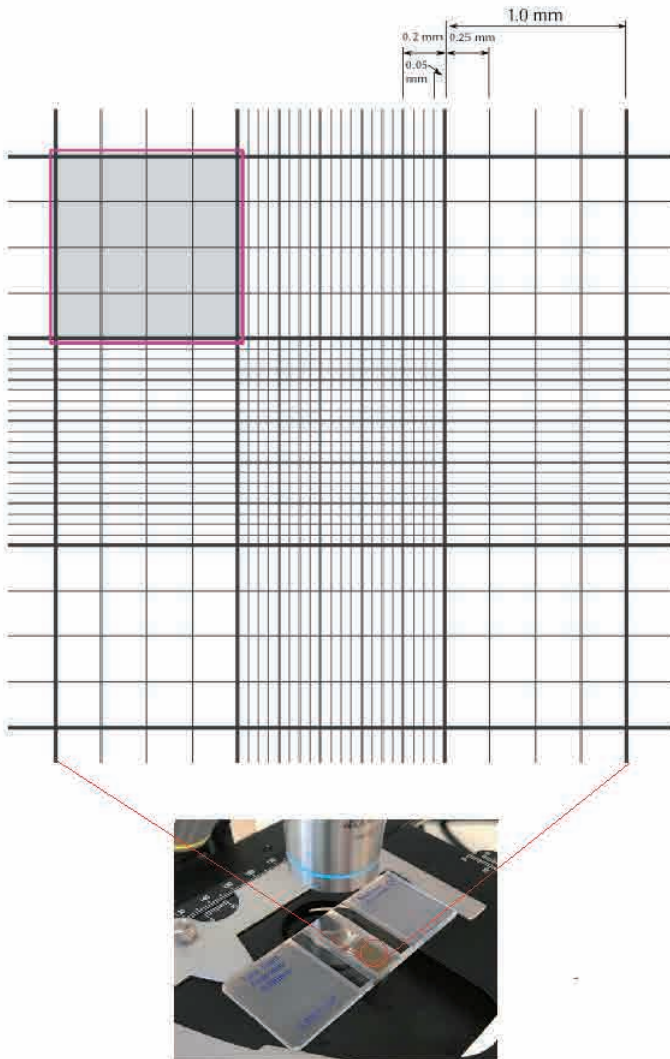
Skema proses pemurnian protoplas.

**Sumber:** <https://nptel.ac.in/courses/102103016/module1/lec12/5.html>

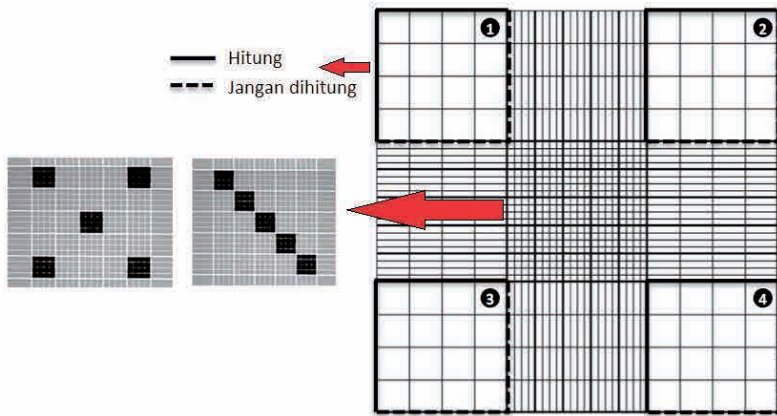
Untuk pengamatan kerapatan protoplas, sampel dari preparasi protoplas yang telah dimurnikan dihitung kerapatannya dengan menggunakan hemositometer sebelum proses kultur atau fusi. Hemositometer mempunyai beberapa bidang-bidang volume yang terdiri atas panjang x lebar x kedalaman. Terdapat sembilan kotak besar pada hemositometer yang berukuran 1 mm x 1 mm dengan kedalaman 0,1 mm, sehingga satu kotak besar memiliki volume 0,1

$\text{mm}^3$  (0,0001 ml). Kotak besar ini dibagi dalam beberapa ukuran kotak yang lebih kecil berukuran 0,2 mm x 0,2 mm pada bagian tengah (kotak ini dibagi lagi menjadi kotak yang paling kecil berukuran 0,05 mm x 0,05 mm), dan 0,25 mm x 0,25 mm serta 0,25 mm x 0,20 mm pada bagian keliling kotak besar yang ditengah (**Gambar 9**).

Larutan protoblas yang telah diencerkan dengan menggunakan 5 ml larutan pencuci dimasukkan dalam hemositometer dengan menggunakan pipet (hindari terjadinya gelembung udara). Kemudian hitung jumlah protoblas yang terdapat pada bidang volume tertentu, misalkan pada 5 kotak kecil yang membentuk pola tertentu pada bidang kotak besar yang terdapat di bagian tengah (**Gambar 10 kiri**), atau pada keempat kotak besar yang terdapat pada bagian atas kiri dan kanan, serta bagian bawah kiri dan kanan (**Gambar 10 kanan**).

**Gambar 9**

Bidang pengukuran pada hemositometer



**Gambar 10**

Contoh pola perhitungan pada hemositometer

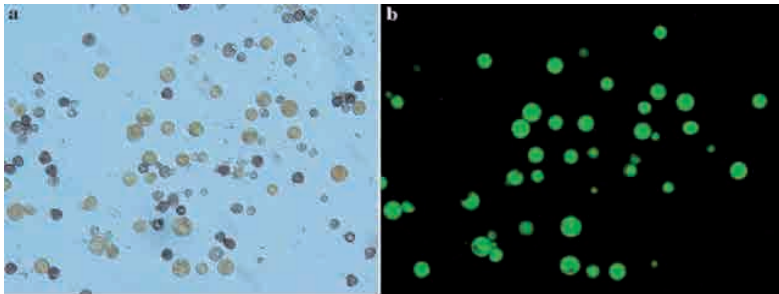
Hasil perhitungan pada kotak tersebut dirata-ratakan, sehingga diketahui jumlah protoptas yang terdapat pada volume tertentu (sesuai ukuran kotak yang digunakan dalam perhitungan).

## C. PENGUJIAN VIABILITAS PROTOPLAS

Pengujian ini dilakukan untuk melihat apakah protoptasma yang didapatkan memiliki viabilitas yang baik. Protoptasma yang memiliki viabilitas yang baik, harus memiliki bentuk bulat ketika diamati dengan mikroskop cahaya. Hal ini menunjukkan protoptas masih utuh dan tidak pecah. Protoptas dapat diwarnai menggunakan pewarna berikut:

- *Metode pewarnaan fluorescein diasetat (FDA)*: FDA terakumulasi di dalam plasmalemma dari protoptas yang viabel. Protoptas hidup mengandung esterase yang memecah

FDA untuk melepaskan fluorescein yang berfluoresensi hijau kekuningan dalam waktu 5 menit dan dapat diamati dengan menggunakan mikroskop fluoresensi. Protoplasma yang mati berwarna merah dan protoplasma yang memiliki viabilitas yang baik akan terlihat berwarna hijau (**Gambar 11**). FDA terdisosiasi dari membran setelah sekitar 15 menit. FDA digunakan pada konsentrasi 0,01% dilarutkan dalam aseton. Larutan FDA untuk melihat viabilitas dari protoplasma juga dapat dibuat dengan menggunakan 25 tetes larutan medium kultur yang ditambah 1 tetes larutan pewarna FDA dan 1 tetes protoplasma agar protoplas tercat dengan baik, kemudian dilihat di bawah mikroskop.

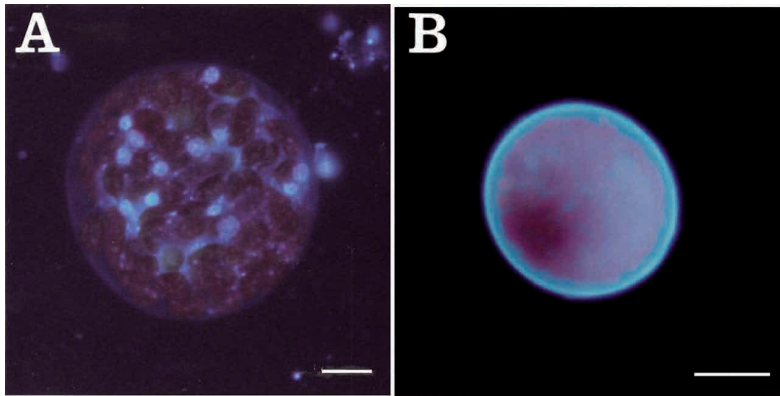


**Gambar 11**

Protoplas dari serbuk sari *B. oleracea* var. *italica*. a Hasil isolasi protoplas dari serbuk sari. b Protoplas yang hidup berwarna hijau diwarnai dengan fluorescein diasetat dan diamati dengan mikroskop fluoresensi.

**Sumber:** Liu et al. (2007)

- *Pewarnaan Calcofluor White*: Metode pewarnaan ini memastikan viabilitas protoplas dengan mendeteksi timbulnya pembentukan dinding sel. Calcofluor berikatan dengan glukosida yang terkait dengan beta dalam dinding sel yang baru disintesis yang dapat diamati sebagai cincin fluoresens di sekitar membrane (**Gambar 12**). Pewarnaan optimal dicapai ketika 0,1 ml protoplas dicampur dengan 5,0  $\mu$ l larutan CFW 0,1% b/v.



**Gambar 12**

Pewarnaan DAPI dan pewarnaan Calcofluor White dari regenerasi protoplas. (A) Nukleus yang diwarnai dengan DAPI, berwarna biru fluoresensi (B) Pewarnaan Calcofluor White menunjukkan akumulasi selulosa pada permukaan membran primer setelah 6 jam.

**Sumber:** Kim et al. (2001)



- *Viabilitas dari protoplas* juga dapat dideteksi dengan memantau pengambilan oksigen sel melalui elektroda oksigen, yang menunjukkan terjadinya respirasi.
- *Variasi dari ukuran protoplas* dengan perubahan konsentrasi larutan osmotik juga memungkinkan untuk mengamati viabilitas dari protoplas.

Viabilitas protoplas dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{viabilitas protoplas} = \frac{\text{Jumlah protoplas berfluoresensi hijau}}{\text{Total jumlah protoplas}} \times 100$$

Jika viabilitas lebih tinggi dari 50%, berarti suspensi protoplas tersebut dapat digunakan untuk proses fusi.

## D. FAKTOR YANG MEMPENGARUHI VIABILITAS DARI PROTOPLAS

Viabilitas dari protoplas yang didapatkan dipengaruhi oleh beberapa faktor, mulai dari pemilihan eksplan yang digunakan sebagai sumber dari protoplas, tahapan perlakuan pra-enzim, yaitu perlakuan yang diberikan pada eksplan sebelum pemberian enzim dan tahapan perlakuan enzim.

- *Sumber Eksplan:* Daun adalah sumber protoplas tanaman yang paling baik karena memungkinkan isolasi protoplas dalam jumlah besar dengan sel yang relatif seragam tanpa membunuh tanaman. Selain itu sel-sel mesofil yang longgar, memudahkan enzim-enzim mengakses dinding sel dengan mudah. Usia tanaman donor/sumber eksplan dan kondisi di mana ia tumbuh memiliki pengaruh yang signifikan terhadap hasil dari protoplas. Hasil dari protoplas juga tergantung pada tingkat pertumbuhan dan

fase pertumbuhan sel. Umumnya kultur suspensi embriogenik digunakan untuk memperoleh protoplas yang memiliki totipotensi yang tinggi.

- *Perlakuan pra-enzim*: Untuk memfasilitasi penetrasi larutan enzim ke dalam ruang antar sel daun, sehingga proses degradasi dinding sel lebih efektif dapat dilakukan dengan mengupas epidermis bawah (seperti yang dijelaskan dalam metode Wu, 2009) dan mengapungkan potongan daun pada larutan enzim dengan cara permukaan daun yang dikupas tersebut bersentuhan dengan larutan (**Gambar 7**). Pengupas epidermis biasanya tidak mudah untuk dilakukan. Oleh karena itu, pemotongan daun atau jaringan menjadi potongan kecil (dengan lebar 1-2 mm) juga dapat dilakukan untuk meningkatkan efektifitas kerja enzim. Ketika dikombinasikan dengan infiltrasi vakum, pencacahan daun terbukti sangat efektif dalam menghasilkan protoplasma yang baik. Menyikat daun dengan sikat lembut atau dengan ujung pisau bedah juga dapat meningkatkan efektifitas enzimatik. Pemotongan atau pencacahan gumpalan kalus besar kemudian baru dimasukkan dalam campuran enzim juga terbukti efektif dalam meningkatkan hasil protoplas dari sel yang dikultur.
- *Perlakuan enzim*: Pelepasan protoplas sangat tergantung pada karakter dan konsentrasi enzim yang digunakan. Dua enzim utama yang diperlukan untuk isolasi protoplas adalah selulase dan pektinase. Selulase diperlukan untuk melisis dinding sel selulosa dan pektinase terutama mendegradasi lamella tengah. Beberapa jaringan mungkin memerlukan enzim lain seperti, hemiselulase, driselase, maserozim dan pektiolas. Aktivitas enzim bergantung pada pH. Umumnya pH yang digunakan dalam proses isolasi protoplas secara enzimatik berkisar antara 4,5-6,0 pada suhu 25-30°C dengan masa inkubasi setengah jam hingga 20 jam. Adanya

cahaya terkadang juga diperlukan untuk inkubasi enzim. Selain itu konsentrasi gula alkohol (seperti manitol) yang digunakan dalam larutan osmotikum juga harus ditentukan secara tepat.

# METODA FUSI PROTOPLAS

Fusi protoplas dapat diperoleh baik secara spontan ataupun dengan teknik yang dapat menginduksi terjadinya fusi.

## A. METODE FUSI SPONTAN

Selama proses isolasi protoplas dapat terjadi penggabungan atau fusi antar protoplas secara spontan yang disebut sebagai fusi/peleburan spontan. Pada saat aplikasi enzim untuk mendegradasi dinding sel dalam isolasi protoplas, terjadi fusi spontan antar protoplasma yang berdekatan melalui plasmodesmata dan menghasilkan multi nukleat protoplas.

Peleburan protoplasma secara spontan biasanya terjadi karena membran protoplas yang sangat tipis dan lunak sehingga mudah sobek atau pecah yang dapat mengakibatkan peleburan protoplasma. Biasanya terjadi pada protoplasma yang diisolasi dari kalus. Perleburan protoplasma dengan teknik ini biasanya terjadi pada protoplasma yang berasal dari tanaman yang sama sehingga umumnya tidak begitu bernilai untuk perbaikan genetik tanaman.

## B. METODE INDUKSI FUSI

Untuk induksi fusi diperlukan adanya agen (dikenal sebagai fusagen) untuk memacu terjadinya peleburan protoplasma. Bahan kimia yang digunakan sebagai fusagen berperan untuk menurunkan elektronegativitas dari protoplasma yang telah diisolasi dan menginduksi mereka untuk bergabung satu sama lain, ataupun penggunaan arus listrik untuk membantu fusi (elektrofusi).

Umumnya protoplas yang telah diisolasi sulit untuk berfusi atau melebur satu sama lain. Hal ini dikarenakan permukaan protoplas disekeliling bagian terluar dari plasma membran memiliki muatan negatif (-10mV to -30mV). Sehingga mereka cenderung untuk saling menjauh (tolak menolak) dikarenakan mengandung muatan yang sejenis. Oleh karena itu, diperlukan bahan kimia yang dapat menginduksi terjadinya fusi dengan menurunkan muatan elektronegatif dari protoplas sehingga memungkinkan terjadinya fusi antar protoplas-protoplas tersebut (Narayanswamy, 1994). Beberapa metoda yang dapat dilakukan untuk menginduksi terjadinya fusi protoplas adalah sebagai berikut.

### 1. Fusi mekanik

Dalam proses ini protoplas yang telah diisolasi didekatkan sehingga terjadi kontak yang sangat dekat secara fisik yang memungkinkan mereka melebur dengan menggunakan mikro manipulator atau mikropipet untuk fusi dibawah mikroskop. Teknik fusi secara mekanik ini kurang aplikatif untuk diterapkan karena frekuensi fusi yang terjadi sangat rendah dibandingkan dengan teknik kemofusi atau elektrofusi.

## 2. Kemofusi

Kemofusi dilakukan dengan menggunakan bahan kimia (*Fusagen*) yang dapat menginduksi terjadinya fusi protoplas. Keberhasilan fusi protoplas pertama menggunakan kemofusi dilaporkan oleh Power et al. (1970) dengan sodium nitrat sebagai fusagen. Selanjutnya Carlson et al. (1972) melaporkan keberhasilan regenerasi hibrida somatik pertama dari tanaman *Nicotiana glauca* dan *N. langsdorfii* dari kemofusi yang juga menggunakan sodium nitrat. Tetapi, belakangan diketahui bahwa sodium nitrat kurang baik digunakan sebagai fusagen karena bersifat toksik bagi sebagian besar protoplas tanaman.

Beberapa bahan kimia yang biasanya digunakan untuk kemofusi ini diantaranya adalah sodium nitrat, polyethylene glycol (PEG), ion Calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ), lysozyme, concavalin, polyvinyl alcohol, dextran sulphate. Fusagen kimia menyebabkan protoplas untuk mendekat satu sama lain dan menyebabkan aglutinasi yang sangat dekat dan selanjutnya akan diikuti oleh fusi protoplas.

Suatu metoda kemofusi dengan menggunakan fusagen sodium nitrat adalah dengan memperlakuan protoplasma dalam larutan sodium nitrat (5,5%) dan larutan sukrose (10%). Kemudian kultur diinkubasikan dalam *water bath* bersuhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 200 g selama 5 menit. Selanjutnya supernatan dibuang dan pelet disimpan dalam *water bath* bersuhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Pada beberapa saat akan terjadi peleburan protoplasma. Agregat dituangkan secara hati-hati pada medium kultur yang telah ditambah 0,1%  $\text{NaNO}_3$ . Teknik ini akan menghasilkan protoplasma dengan frekuensi rendah jika sumber protoplasmanya dari jaringan mesofil daun.

Fusi protoplas dengan menggunakan ion calcium sebagai fusagen pada pH tinggi juga dapat dilakukan. Teknik ini telah digunakan pada fusi protoplasma tanaman tembakau. Caranya protoplasma yang telah diisolasi ditambahkan larutan fusagen berupa 0,5 M mannitol yang berisi 0,05 M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  pada pH 10,5 selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 50 g selama 3 menit. Selanjutnya tabung sentrifugasi disimpan dalam water bath bersuhu  $37^\circ\text{C}$  selama 40-50 menit hingga protoplasma melebur.

Dari sekian banyak metode peleburan protoplasma, peleburan dengan menggunakan perlakuan polyethelene glycol (PEG) merupakan metode yang paling sering digunakan dan berhasil dengan baik. Teknik ini dapat menghasilkan fusi protoplas dengan frekuensi yang tinggi dan dapat digunakan untuk protoplas dari berbagai spesies tanaman. Fusi protoplas dengan menggunakan PEG sebagai fusagen pertama kali dilaporkan pada tahun 1974 (Fish, 1988).

Fusi protoplasma dengan menggunakan PEG dapat dilakukan dengan mencampurkan suspensi protoplasma yang terdapat dalam medium kultur dengan larutan PEG 28-56% (1500-6000 MW) sebanyak 1 ml. Tabung digoyang selama 5 detik dan biarkan berhenti 10 menit. Selanjutnya suspensi protoplasma tersebut dipindahkan dari larutan PEG dengan cara mencucinya menggunakan medium kultur sebanyak 2 kali. Hasil peleburan protoplasma ini berupa pembentukan heterokarion dengan frekuensi yang tinggi.

Tidak hanya digunakan dalam fusi protoplas pada sel tanaman, penggunaan PEG juga sering digunakan dalam fusi sel bakteri. Pada penelitian yang dilakukan oleh Iwata et al. (1986), polyetilen glycol (PEG) berhasil menginduksi terjadinya fusi protoplas pada *Lactobacillus fermentatum* 604 yang membawa plasmid tetracycline resisten ( $\text{Tet}^r$ ) dan *L. fermentatum* 605 yang membawa plasmid erythromycin resisten ( $\text{Ery}^r$ ).

Pada studi yang dilakukan oleh Srinivas dan Panda (1997), yang melakukan kemofusi antara protoplas dari *Trichoderma reesei* QM9414 dan *Saccharomyces cerevesei* NCIM 3288, menunjukkan bahwa enzim *endoglukanase* berperan besar dalam keberhasilan fusi protoplas tersebut.

Frekuensi fusi protoplas dengan menggunakan PEG dapat ditingkatkan dengan memberi beberapa tambahan bahan kimia sebagai fasilitator, diantaranya adalah *dimethylsulphoside* (DMSO), *Concanavalin A*, atau *dextran* (Fish, 1988).

Meskipun fusagen kimia PEG sering digunakan dalam induksi fusi, tetapi ada beberapa kelemahan yang terkait dengan penggunaannya. Misalnya, penggunaan PEG terbatas pada protoplas yang kuat. Hal ini dikarenakan PEG dapat dengan cepat merusak protoplas dari sel mesofil yang rapuh.

Kemofusi atau fusi dengan bantuan bahan kimia bersifat non spesifik, murah, dapat menyebabkan hasil fusi yang masif (banyak). Fusi protoplas dengan menggunakan bahan kimia ditinjau memiliki beberapa kekurangan. Diantaranya adalah, proses fusi sebagian besar tidak terkendali dan hasilnya sangat bervariasi. Selain itu, biasanya bahan kimia yang digunakan sebagai fusagen bisa bersifat sitotoksik.

### 3. Elektrofusi

Teknik fusi protoplas dengan metode elektrofusi ini dilakukan dengan menggunakan stimulasi arus listrik bertegangan rendah sehingga protoplas terinduksi untuk bergabung. Pengembangan metode induksi elektrofusi ini merupakan solusi terhadap kekurangan dari kemofusi, sehingga dapat menghasilkan metoda fusi protoplas yang lebih terkontrol dan *reproducible*.



Pada metode ini, dua gelas kapiler mikroelektroda diletakkan dalam suspensi protoplas. Adanya arus listrik berkekuatan kelemahan rendah ( $10\text{Kvm}^{-1}$ ) akan menimbulkan dielektroforesis dalam suspensi protoplas. Hal ini mengakibatkan pengaturan protoplas seperti rangkaian mutiara. Kemudian, melalui medan listrik berkekuatan tinggi ( $100\text{KVM}^{-1}$ ) selama beberapa mikrodetik akan mengakibatkan pemutusan muatan listrik membran dan selanjutnya terjadi fusi protoplas (Ushijima *et al* 1991; Jogdand 2001). Untuk menginduksi fusi, diperlukan ion  $\text{Ca}^{++}$ , atau Polyethylene glikol 400 (PEG) sehingga dapat meningkatkan terjadinya fusi protoplas.

Besar kecilnya arus listrik yang dibutuhkan agar terjadinya fusi protoplas sangat bergantung dari jenis protoplas yang digunakan. Pada elektrofusi ragi (yeast), Urano *et al* (1998) melaporkan bahwa perilaku fusi membran sel khamir yang kekurangan respirasi ( $\text{P}^-$ ) sangat berbeda dari ragi normal ( $\text{P}^+$ ) pada kondisi elektrofusi yang berbeda. Induksi fusi membran sel pada protoplas ragi yang normal ( $\text{P}^+$ ) terjadi di bawah kondisi pulsa elektrik ( $2,5 - 5,5\text{ k V cm}^{-1}$  dengan durasi 25-430 mikrodetik) dan interval waktu perubahan dari pulsa panjang ke pendek adalah 3-11 detik. Di sisi lain, induksi fusi membran sel pada protoplas  $\text{P}^-$  terjadi di bawah kondisi pulsa yang lebih tinggi ( $4,0-7,0\text{ k V cm}^{-1}$  dan durasi: 20-500 mikrodetik). Interval waktu perubahan dari panjang ke pendek adalah 110-170 detik. Muatan permukaan protoplas  $\text{P}^-$  lebih negatif dari pada protoplas  $\text{P}^+$ . Oleh karena itu, regulasi elektrofusi antara berbagai jenis strain ragi tidak sama.

Kelebihan dari elektrofusi adalah lebih mudah dikontrol atau dikendalikan, memiliki frekuensi fusi yang tinggi hingga 100%, bersifat reproduisible, tidak mengakibatkan toksik, tetapi membutuhkan peralatan yang canggih dan cukup mahal.

# MEKANISME FUSI PROTOPLAS

Mekanisme terjadinya fusi protoplas tidak sepenuhnya diketahui. Pada fusi spontan diduga dikarenakan sobek atau pecahnya membran protoplas yang sangat tipis dapat mengakibatkan peleburan protoplasma. Sedangkan beberapa penjelasan yang lain yang pernah dikemukakan untuk memahami mekanisme fusi protoplas akibat adanya induksi fusi yaitu ketika protoplas saling berdekatan satu sama lain, dan diikuti dengan proses induksi sehingga merubah potensial elektrostatik dari membran sel yang akhirnya mengakibatkan terjadinya fusi atau penggabungan kedua protoplas. Setelah terjadi fusi, membran sel menstabilkan keadaan sel dan potensial permukaan membran sel kembali ke keadaan semula.

Penjelasan mekanisme fusi protoplas yang lain yaitu ketika protoplas berada sangat dekat atau melekat erat, fusagen eksternal (agen penginduksi fusi) menyebabkan gangguan pada protein dan glikoprotein intramembran. Hal ini meningkatkan fluiditas membran dan menciptakan suatu wilayah di mana molekul lipid bercampur, sehingga memungkinkan peleburan dari membran sel yang berdekatan.

Muatan negatif yang terdapat pada protoplas terutama disebabkan oleh gugus fosfat yang terdapat pada intramembran. Penambahan ion  $\text{Ca}^{++}$  menyebabkan berkurangnya potensi zeta membran plasma dan dalam situasi seperti ini protoplas dapat menyatu.

Larutan alkali tinggi yang digunakan dalam *chemo-fusion* (kemofusi) menginduksi produksi lysophospholipid intra-membran yang berkemungkinan terkait dengan fusi membran. Berat molekul dari polymer PEG yang tinggi (berkisar antara 1000-6000) berperan sebagai jembatan molekuler yang menghubungkan kedua protoplas. Ion kalsium akan menghubungkan muatan negatif dari PEG dengan permukaan membran. Ketika terjadi elusi dari PEG, potensi permukaan membran akan terganggu, sehingga mengakibatkan terjadinya kontak intramembran dan selanjutnya terjadi fusi. Selain itu, afinitas yang kuat dari PEG terhadap air dapat menyebabkan dehidrasi lokal pada membran dan terjadi peningkatan fluiditas, sehingga mendorong terjadinya fusi. PEG sendiri dapat menginduksi agregasi, tetapi adanya  $\alpha$ -tokoferol sebagai pengotor dalam PEG komersial, sebenarnya meningkatkan fusi membran.

Fusi protoplas terjadi ketika jarak molekuler antara protoplas adalah 10 Å atau kurang (Narayanswamy 1994; Jogda 2001). Satuan ångström (Å) menunjukkan satuan jarak atau panjang yang setara dengan  $10^{-10}$  meter (m), 1 Å = 0.1 nanometer (nm), sehingga 10 Å sama dengan 1 nanometer (nm).

# IDENTIFIKASI DAN SELEKSI HIBRIDA HASIL FUSI

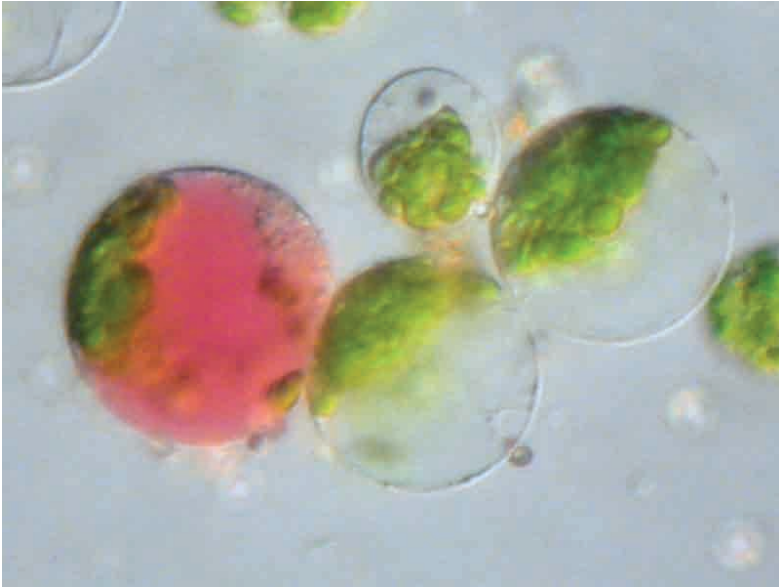
Setelah terjadi fusi protoplas yaitu terjadi penggabungan protoplas dari kedua tanaman donor (parental), didapatkan produk hasil fusi baik homokaryotik maupun heterokaryotik. Proporsi fusi heterokaryotik yang berkualitas baik/viabel umumnya lebih rendah.

Identifikasi dan seleksi produk hasil fusi protoplas umumnya didasarkan pada pengamatan secara visual dari sel hibrida yang menunjukkan komplemen genetik untuk beberapa karakter pertumbuhan, dll.

## A. SELEKSI SECARA VISUAL

Pada sebagian besar program fusi protoplas, umumnya prosedur seleksi melibatkan fusi antara protoplas yang berwarna selain hijau dari satu salah satu tanaman donor dan protoplas yang berwarna hijau dari tanaman donor lainnya. Metoda ini akan memudahkan proses identifikasi secara visual di bawah mikroskop cahaya terhadap pengamatan produk fusi heterokaryon. Protoplas yang berwarna

selain hijau bisa didapatkan dari jaringan kalus atau jaringan lain (seperti petal dari bunga), sedangkan protoplas yang berwarna hijau bisa berasal dari jaringan daun (**Gambar 13**).



**Gambar 13**

Fusi protoplas (kiri) dari dua sel yang berwarna hijau dan mengandung kloroplas (berasal dari protoplasma sel daun) dan sel yang berwarna selain hijau dengan vakuola berwarna (berasal dari protoplasma sel kelopak bunga).

**Sumber:** [http://www.wikiwand.com/en/Somatic\\_fusion](http://www.wikiwand.com/en/Somatic_fusion)

## **B. FLUORESCENCE LABEL**

Sebelum dilakukan fusi protoplas, masing-masing protoplas tetua fusi dilabel dengan menggunakan pewarna fluoresens yang berbeda, seperti fluorescein atau rhodamin isothiocyanate. Sehingga heterokaryon yang dihasilkan dapat dengan mudah diamati dibawah sinar UV karna menghasilkan campuran cahaya fluoresens dari kedua tetuanya. Hibrida somatik selanjutnya dapat diisolasi secara manual dengan menggunakan pipet mikro (Patnaik et al. 1982).

## **C. SELEKSI SECARA KOMPLEMEN**

Jika protoplas dari kedua tanaman donor (parental) dapat diidentifikasi dengan penanda biokimiawi maka heterokaryon dapat dipilih dengan mudah dengan menggunakan media yang tepat.

### **1. Komplemen dari Marka Resistensi:**

Beberapa karakter dominan seperti sifat resistensi/ ketahanan terhadap antibiotik, analog asam amino atau senyawa toksik tertentu dapat dijadikan sebagai penanda atau marka. Ketika terjadi fusi protoplas dari dua spesies yang berbeda maka seleksi terhadap terjadinya fusi dapat dilakukan dengan mengamati keberadaan gabungan dari produk atau metabolit dari kedua individu. Misalnya untuk karakter resistensi/ketahanan dapat dievaluasi dari adanya resistensi ganda yang lebih kuat dibandingkan dengan resistensi dari salah satu tetua.

## 2. Penggunaan Inhibitor/Penghambat Metabolik:

Protoplas dari kedua tetua diperlakukan dengan bahan biokimia penghambat yang *irreversible* (tidak dapat berubah kembali seperti semula) seperti *iodoacetate* atau *di-ethyl-pyro-carbamate*. Sehingga protoplas yang tidak berfusi tidak mampu berkembang, dan hanya sel hibrida hasil fusi yang mampu tumbuh dan membelah.

## 3. Pelengkap Auxotroph

Kedua protoplas tetua dimutasi untuk enzim yang sama tetapi keduanya memiliki dua jenis mutasi yang berbeda. Sehingga hanya sel hibrida hasil fusi protoplas yang dapat tumbuh dengan mudah karena saling melengkapi dan mampu menghasilkan enzim yang aktif.

## 4. Komplementasi Kekurangan Klorofil

Metode ini sering digunakan untuk memilih hasil hibrida somatik di mana protoplas tanaman normal berfusi dengan tanaman albino atau jenis protoplas yang mengalami mutasi sehingga kekurangan klorofil. Hasil fusi hibrida somatik akan menghasilkan koloni hijau dengan komplementasi.

# KULTUR DAN REGENERASI PROTOPLAS

Kultur protoplasma dilakukan untuk menginduksi terbentuknya dinding sel kembali dan meregenerasikan sel tersebut menjadi tanaman yang utuh.

## A. PEMBENTUKAN DINDING SEL

Perkembangan protoplasma diawali dengan regenerasi atau terbentuknya dinding sel diikuti terbentuknya koloni sel menyerupai kalus. Selama periode kultur, protoplas dapat membentuk dinding sel baru. Setelah dinding sel terbentuk, protoplas menjadi sel yang utuh.

Induksi pembentukan dinding sel dilakukan selama periode kultur dengan memberikan perlakuan media yang sesuai untuk menginduksi terbentuknya dinding sel kembali pada protoplasma. Protoplasma yang hidup diambil dalam jumlah memadai (frekuensi protoplas viable 100–200 sel) selanjutnya ditanam pada media kultur dan disimpan di tempat gelap pada temperatur 28 °C selama semalam. Protoplas yang telah diisolasi dapat dikulturkan baik dalam media



cair, media padat atau media semi padat. Untuk media padat biasanya digunakan agarose sebagai bahan pematat media. Kadang-kadang protoplas dikulturkan terlebih dahulu dalam media cair dan kemudian ditransfer ke dalam petri dish yang berisi media agar.

Komposisi media yang digunakan untuk kultur protoplasma jauh lebih kompleks dibandingkan dengan media untuk teknik kultur jaringan lainnya. Hal ini dikarenakan protoplasma belum memiliki dinding sel sehingga perlu ditanam pada media awal yang diperkaya dengan larutan osmotikum (misalnya sorbitol atau mannitol) untuk menghindari terjadinya plasmolisis. Penggunaan larutan osmotikum yang cocok untuk protoplas sampai mampu meregenerasikan dinding sel yang kuat merupakan faktor yang sangat penting dalam kultur protoplas.

Protoplast mulai meregenerasikan dinding sel dalam beberapa hari (2-4 hari) setelah dikulturkan. Bahkan pada jenis protoplas yang mudah beregenerasi, sintesis dinding sel sudah dapat dimulai sekitar beberapa jam setelah periode kultur (Tylicki et al. 2001). Selama proses ini, protoplas kehilangan karakteristik bentuk bulatnya sebagai indikasi terjadinya regenerasi dinding sel baru. Regenerasi dinding sel dapat dikonfirmasi dengan metode pewarnaan Calcofluor White (**Gambar 10**).

Terdapat hubungan langsung antara pembentukan dinding dan pembelahan sel. Struktur dinding sel dan perubahan dinamisnya merupakan penanda yang tepat dari perkembangan sel (Malinowski dan Filipecki 2002). Pembentukan dinding sel dan perubahan lebih lanjut dari laju pembentukan dinding sel, serta komposisi dan sifat fisik-kimia dari regenerasi dinding sel tersebut mempengaruhi aktivitas mitosis sel. Protoplas yang tidak mampu meregenerasikan dinding selnya secara sempurna akan gagal menjalani mitosis secara normal.

Protoplas dengan dinding sel yang kurang berkembang sering menunjukkan adanya pertumbuhan tunas dengan ukuran yang dapat lebih besar beberapa kali dari volume aslinya. Sel-sel ini biasanya multinukleat karena karyokinesis tidak disertai oleh sitokinesis. Keabnormalan ini dapat juga disebabkan oleh pencucian protoplas yang tidak sempurna sebelum regenerasi dari protoplas.

Selulosa ( $\beta$ -1,4-glukan) adalah polymer yang paling banyak dijumpai pada dinding sel tanaman, yang merupakan 30–90% dari struktur dinding sel. Respons dari kultur protoplas juga bisa dikaitkan dengan adanya protein *arabinogalactan* pada dinding sel. Protein ini sering dianggap sebagai penanda dari dinding sel suatu tanaman dan merupakan pembawa informasi dalam komunikasi antar sel. *Protein Arabinogalactan* berperan dalam pengikatan komponen yang tepat pada dinding sel yang baru terbentuk (Wiszniewska dan Piwowarczyk 2014).

Proses kesempurnaan pembentukan dinding sel juga dapat dipengaruhi oleh kondisi cahaya, pH, dan suhu. Setelah pembentukan dinding sel selesai, sel menjalani pembelahan yang menghasilkan ukuran sel yang meningkat. Setelah selang waktu 3 minggu, koloni sel kecil muncul, koloni ini ditransfer ke media induksi kalus bebas osmotik.

## **B. REGENERASI PROTOPLASMA**

Sel-sel yang sudah sempurna, dimana dinding sel sudah terbentuk kembali selanjutnya akan memasuki tahapan pembelahan sel yang diikuti dengan pembentukan kalus dan kultur sel. Diantara kalus yang terbentuk, terdapat kalus yang memiliki kemampuan morfogenesis melalui organogenesis atau embryogenesis dan beregenerasi menjadi tanaman.

Regenerasi protoplasma membentuk koloni sel dan kemudian menjadi tanaman lebih sulit dibandingkan dengan regenerasi tanaman dalam teknik kultur jaringan pada umumnya. Salah satu teknik yang digunakan untuk merangsang regenerasi dari sel hasil fusi protoplasma adalah menggunakan sel-sel lain yang berperan sebagai sel perawat, sehingga tekniknya disebut dengan teknik "*Nurse Culture*". Untuk kultur satu protoplasma, "*nurse cells*" diletakkan berdekatan dengan kultur protoplasmanya untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan protoplasma. Teknik ini pertama kali diperkenalkan oleh Muir dkk (Muir et al. 1954).

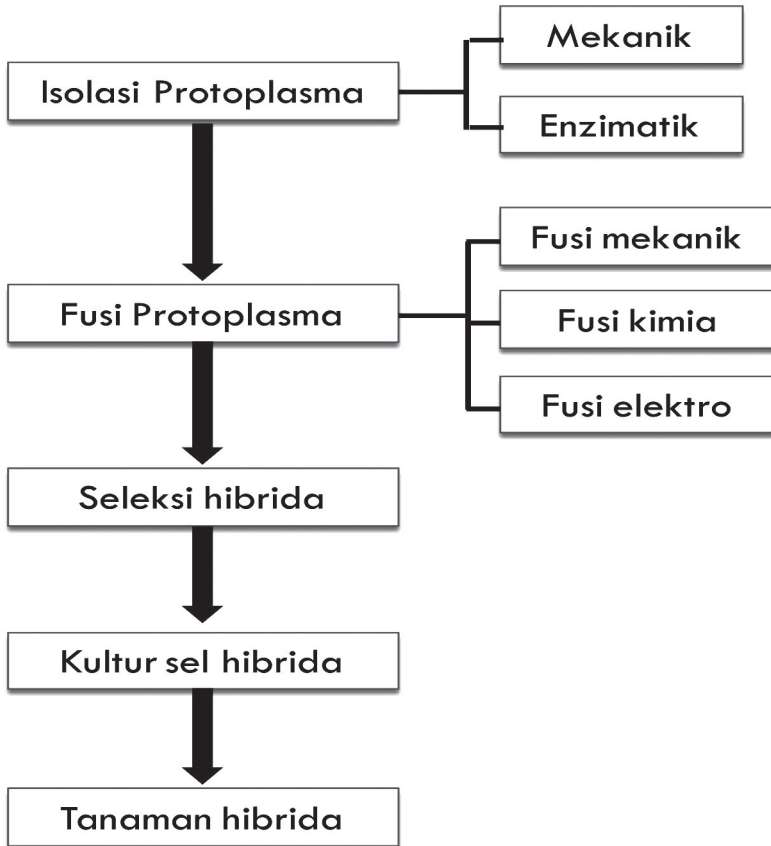
Tanaman yg dihasilkan dari kultur protoplasma bisa seragam atau bervariasi, disebut "protoplast variation". Selama periode kultur protoplasma, dapat ditambahkan mutagen ke dalam media untuk menginduksi terjadinya mutasi, sehingga hasil regenerasi akan menghasilkan tanaman dengan variasi hasil mutasi (menghasilkan tanaman baru). Secara ringkas tahapan prosedur fusi protoplasma disajikan pada **Gambar 14**.

Produksi tunas pada kultur sel protoplasma dapat dilakukan dengan menambahkan hormon penginduksi pembentukan tunas yaitu berupa sitokinin (misalnya dengan meneberikan 0,5M BAP) kedalam media kultur. Setelah tunas terbentuk cukup besar, tunas selanjutnya dapat diakarkan. Salah satu contoh media pengakaran protoplasma adalah dengan menggunakan media 1/2 MS + 3-aminopyridine (untuk tanaman tembakau) atau picloram (untuk tanaman tebu). Setelah terbentuk plantlet yang akhirnya menjadi tanaman utuh yang disebut sebagai tanaman hasil hibrida somatik. Plantlet yang cukup besar selanjutnya diaklimatisasi kemudian ditanam di lapangan. Beberapa contoh protoplasma tanaman yang berhasil beregenerasi menjadi tanaman disajikan pada **Tabel 3**.

**Tabel 3.** Spesies tanaman yang protoplas nya berhasil beregenerasi menjadi tanaman

| <b>Nama umum</b> | <b>Spesies</b>               | <b>Family</b> | <b>Sumber Sel</b>  |
|------------------|------------------------------|---------------|--------------------|
| Tembakau         | <i>Nicotiana tabacum</i>     | Solanaceae    | Daun, kultur sel   |
| Kentang          | <i>Solanum tuberosum</i>     | Solanaceae    | Daun               |
| Datura           | <i>Datura innozia</i>        | Solanaceae    | Daun               |
| Petunia          | <i>Petunia hybrida</i>       | Solanaceae    | Daun               |
| Wortel           | <i>Daucus carota</i>         | Umbelliferae  | Kultur sel         |
| Rapeseed         | <i>Brassica napus</i>        | Cruciferae    | Daun               |
| Jeruk            | <i>Citrus sinensis</i>       | Rutaceae      | Kalus sel nusellus |
| Asparagus        | <i>Asparagus officinalis</i> | Liliaceae     | <i>Cladodes</i>    |
| Bromegrass       | <i>Bromus inermis</i>        | Poaceae       | Kultur sel         |

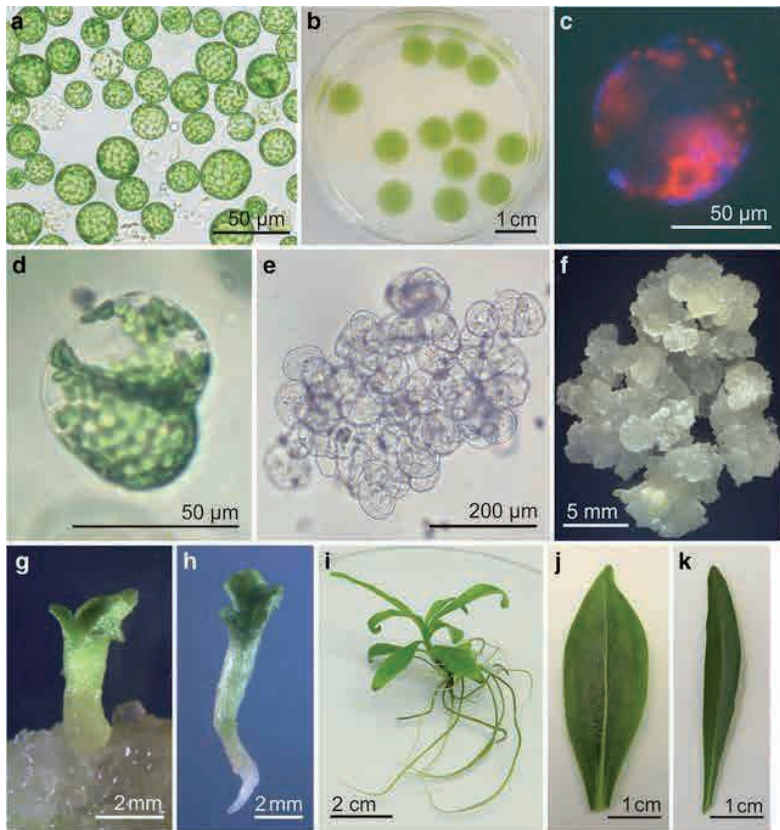
**Sumber:** <http://www.biologydiscussion.com/plants/plant-protoplast/plant-protoplast-culture-meaning-history-and-principles/14773>



**Gambar 14**

Skema umum prosedur fusi protoplas pada tanaman

Tahapan regenerasi dari protoplas menjadi tanaman dapat diamati dalam penelitian yang dilakukan oleh Tomiczak et al (2014), yang melakukan fusi protoplas dari tanaman *Gentiana decumbens* L.f. dan menghasilkan tanaman autotetraploid (**Gambar 15**).



**Gambar 15**

Regenerasi tanaman dari protoplas tanaman *Gentiana decumbens*: (a) protoplas dari sel mesofil daun hijau yang baru saja diisolasi, (b) protoplas dalam kultur pada media agarosa, (c) regenerasi dinding

sel yang ditunjukkan dengan pewarnaan calcofluor, (d) sel anakan terbentuk setelah pembelahan pertama dari sel protoplas, (e) agregat multiseluler yang diperoleh setelah 7 minggu kultur protoplas, (f) kalus berkembang biak pada media kultur protoplasma, (g) regenerasi embrio somatik pada tahap kotiledon, (h) embrio somatik matang sebelum berkembang menjadi planlet, (i) regenerasi menjadi tanaman, (j) daun tanaman hasil fusi protoplas, (k), daun tanaman induk dari benih.

**Sumber:** Tomiczak et al (2014)

---

## C. METODE KULTUR PROTOPLASMA

**Metode cair:** Metode ini sering digunakan pada tahap awal kultur karena memberikan (a) pengenceran dan transfer yang lebih mudah, (b) tekanan osmotik media cair dapat dikurangi secara efektif setelah beberapa hari kultur (c) kepadatan sel dapat dikurangi atau sel-sel tertentu yang diinginkan dapat diisolasi dengan mudah. Dalam media cair, suspensi protoplas dapat dikulturkan sebagai lapisan tipis dalam petridish, diinkubasi sebagai kultur statis dalam tabung, atau dikulturkan dalam petridish dan disimpan dalam ruang yang lembab (**Gambar 16 A**).

Kultur protoplas dengan menggunakan media cair dalam petridish dapat dilakukan dengan metode liquid tetes, yaitu meneteskan suspensi protoplasma sebanyak 5-7 tetes menggunakan pipet yang ukuran 100 -200  $\mu$ l pada cawan petri yang berukuran 60mx15m. Cawan petri ditutup dan direkatkan dengan parafilm atau plastik wrap dan selanjutnya diinkubasi. Setiap 5-7 hari tambahkan medium segar baru dengan cara meneteskan langsung pada tetesan suspensi protoplasma yang telah mengalami pertumbuhan. Metode ini

biasanya baik untuk keperluan pengamatan dengan mikroskop. Kelemahan dari metode ini adalah tetesan-tetesan suspensi menyatu menjadi satu tetesan di pusat.

**Metode padat dengan agarose:** Agarose adalah jenis agar yang terbaik dalam kultur media padat karena dapat meningkatkan respons dari kultur. Metode biakan agar ini menjaga protoplas dalam posisi tetap, sehingga mencegah protoplas membentuk gumpalan. Pada keadaan statis protoplas akan membentuk klon yang kemudian dapat ditransfer ke media lain. Dalam praktiknya, protoplas yang tersuspensi dalam media agarosa yang masih cair (40 °C) (1,2% w / v agarosa) dituangkan (4ml) ke dalam petri dish kecil (diameter 3,5-5cm) dan dibiarkan mengeras. Lapisan agarosa kemudian dipotong menjadi 4 blok berukuran sama dan dipindahkan ke petri yang lebih besar (diameter 9 cm) yang mengandung media cair dengan komposisi yang sama.

Media padat dengan agarose dapat juga digunakan untuk kultur dengan metode tetes menggantung. Dengan menggunakan pipet, suspensi protoplasma dengan volume 40-100 µl ditetaskan di dalam tutup cawan petri, selanjutnya cawan petri ditutup dengan menggunakan tutup yang telah ditetesi suspensi protoplasma, sehingga tetesan suspensi tersebut akan menggantung di dalam tutup cawan petri tersebut.

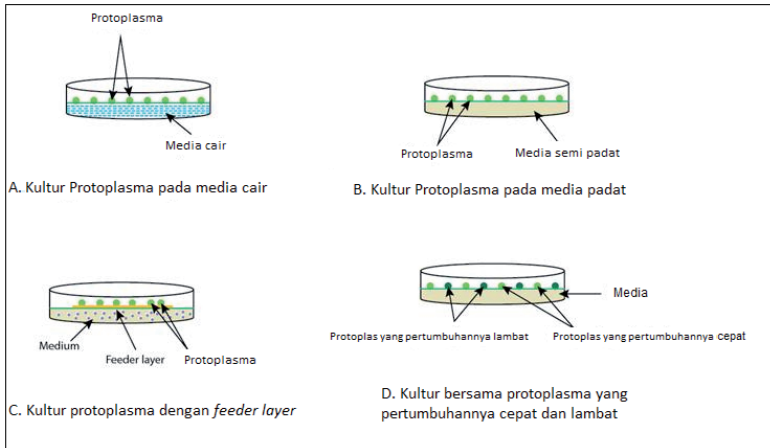
Pada kultur protoplasma tanaman tembakau, penanaman protoplasma ke dalam media dilakukan dengan cara mencampur protoplasma dengan larutan agarose. Campuran disedot dengan pipet pasteur steril kemudian ditetaskan pada cawan petri steril (5 –10 tetes per petri). Cawan petri ditutup dengan parafilm selanjutnya kultur diletakkan pada ruang kultur dengan suhu 25C dan diberikan 16 jam penyinaran. Setiap 2 minggu ditambahkan media baru ke bagian tetesan protoplasma tersebut.



Protoplasma sering dikulturkan dalam media liquid untuk meregenerasi dinding sel terlebih dahulu, sebelum dikulturkan ke media agar. Teknik media liquid biasanya digunakan pada fase awal kultur, karena mudah larut dan diserap oleh protoplas. Pada beberapa spesies, protoplasmanya tidak dapat membelah dalam media agar, tekanan osmotik media direduksi secara efektif (**Gambar 16 B**).

**Feeder layer/lapis pengumpan:** Untuk mengkultur protoplas pada kepadatan rendah, dapat dilakukan dengan menggunakan *feeder layer* atau teknik lapis pengumpan. Protoplas yang tidak membelah tetapi secara metabolik masih aktif diradiasi dengan sinar-X dan digunakan sebagai *feeder layer* (lapisan pengumpan). Kemudian *feeder layer* ini digunakan untuk melapisi media agar. Protoplas yang tidak diradiasi dengan kepadatan rendah dikulturkan di atas *feeder layer* ini. *Feeder layer* atau lapisan pengumpan dapat menggunakan protoplas dari spesies yang sama atau spesies yang berbeda (**Gambar 16 C**).

**Kultur bersama:** Metode ini melibatkan kultur protoplas dari dua spesies berbeda untuk meningkatkan pertumbuhan dari protoplas sel hibrida. Protoplas yang aktif secara metabolik dan membelah dari dua tipe, yaitu yang pertumbuhannya lambat dan pertumbuhannya cepat dikulturkan secara bersama. Protoplas yang tumbuh cepat memberikan bahan kimia dan faktor pertumbuhan yang membantu pembentukan dinding sel dan pembelahan sel secara difusi kepada spesies tanaman yang pertumbuhan protoplasnya lambat. Metode kultur bersama umumnya digunakan di mana kalus yang timbul dari dua jenis protoplas dapat dibedakan secara morfologis, misalnya, protoplas yang diisolasi dari tanaman albino dan tanaman hijau. Kedua protoplasma ini mudah dibedakan berdasarkan warna di mana protoplas albino akan mengembangkan koloni yang tidak berwarna hijau (non-hijau) (**Gambar 16 D**).

**Gambar 16**

Beberapa metode kultur protoplasma.

**Sumber:** <https://nptel.ac.in/courses/102103016/module1/lec12/7.html>

## D. MEDIA KULTUR PROTOPLAS

Media yang digunakan dalam kultur protoplasma terdiri dari garam mineral, vitamin, sumber karbon dan hormon pertumbuhan tanaman, stabilisator osmotik dan sumber nitrogen organik, seperti air kelapa muda dan asam organik. Kebutuhan nutrisi protoplas pada dasarnya hampir mirip dengan kebutuhan kultur sel tanaman, tetapi sedikit lebih kompleks.

Sebagian besar garam dari media MS (Murashige dan Skoog, 1962) dan B5 (Gamborg et al. 1968) sering digunakan dalam kultur protoplas (Grzebelus et al 2012). Namun diperlukan beberapa modifikasi, seperti garam amonium yang umumnya digunakan dalam media

kultur sel tanaman biasa, diamati dapat merusak kelangsungan hidup protoplas dari beberapa spesies tanaman. Oleh karena itu, media kultur protoplas biasanya memiliki konsentrasi/kandungan garam amonium yang rendah, bahkan tanpa menggunakan garam amonium sama sekali (Tomiczak et al. 2015). Konsentrasi seng (Zn) dalam media harus dikurangi, sementara konsentrasi kalsium ditingkatkan, karena kalsium dapat meningkatkan stabilitas membran. Penambahan sorbitol, manitol, glukosa atau sukrosa dan manitol juga dilakukan dalam media kultur protoplas, karena senyawa senyawa tersebut digunakan sebagai larutan osmotikum yang dapat mempertahankan osmolaritas medium.

Glukosa adalah sumber karbon yang lebih disukai dalam kultur protoplas dibandingkan dengan sukrosa. Umumnya, satu atau dua jenis asam amino pada konsentrasi rendah ditambahkan dalam media kultur. Zat pengatur pertumbuhan juga diperlukan dalam kultur protoplas. ZPT yang digunakan biasanya berupa auksin konsentrasi tinggi (NAA, 2,4-D) bersama dengan konsentrasi sitokinin yang lebih rendah (BAP, Zeatin).

Kombinasi bahan yang digunakan dalam media kultur protoplas, media yang digunakan untuk proliferasi kalus, dan media regenerasi tanaman akan mempengaruhi keseluruhan proses regenerasi protoplasma. Hasil penelitian Tomiczak et al. (2015) pada perakitan tanaman autotetraploid *Gentiana decumbens* L.f., efisiensi protoplas yang membelah dan membentuk mikro kalus tertinggi diperoleh pada media kultur protoplas yang terdiri atas garam media MS (tanpa  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) + vitamins +  $30 \text{ g L}^{-1}$  glukosa +  $3.0 \text{ g L}^{-1}$  glutamin +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  NAA +  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  thidiazuron. Peningkatan proliferasi kalus juga dapat dilakukan dengan menambahkan thidiazuron menggunakan media proliferasi kalus (MS + vitamins +  $30 \text{ g L}^{-1}$  sukrosa +  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$

NAA + 0,2 mg L<sup>-1</sup> thidiazuron). Sedangkan embriogenesis somatik diinduksi dari mikrokalli pada media regenerasi tanaman berupa media MS + vitamins + 30 g L<sup>-1</sup> sukrosa + 20 ml L<sup>-1</sup> air kelapa + 1,5 mg L<sup>-1</sup> Kinetin + 0,5 mg L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 80 mg L<sup>-1</sup> Adenin Sulfat.

Kondisi lingkungan kultur juga mempengaruhi regenerasi dari protoplas. Misalnya, intensitas cahaya yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan protoplas, oleh karena itu protoplas ditanam dalam cahaya redup selama beberapa hari terlebih dahulu dan kemudian baru dipindahkan pada ruang dengan cahaya sekitar 2000-5000 lux. Namun, hasil yang lebih baik diperoleh saat protoplas dikulturkan dalam kondisi gelap.

Selain cahaya, suhu inkubasi juga mempengaruhi persentase pembelahan sel dalam kultur protoplasma. Persentase pembelahan sel meningkat jika kultur protoplas diinkubasikan pada suhu 26 °C dibandingkan dengan suhu 21 °C (Grzebelus et al. 2012; Tomiczak et al. 2015).

## E. KEPADATAN KULTUR PROTOPLAS

Seperti kultur sel, kepadatan dari protoplas yang dikulturkan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap efisiensi dari kultur. Protoplas umumnya dikulturkan pada kerapatan 1 x 10<sup>4</sup> hingga 1 x 10<sup>5</sup> protoplas per ml medium. Pada kepadatan yang tinggi, koloni sel yang timbul dari individu protoplas cenderung tumbuh bergabung satu sama lain yang menghasilkan jaringan chimera jika populasi protoplas secara genetik heterogen. Kloning individu sel yang diinginkan dalam hibridisasi somatik dan studi mutagenik dapat dicapai jika protoplas atau sel yang berasal darinya dapat dikultur pada kepadatan rendah.



# VERIFIKASI DAN KARAKTERISASI TANAMAN HASIL HIBRIDA SOMATIK

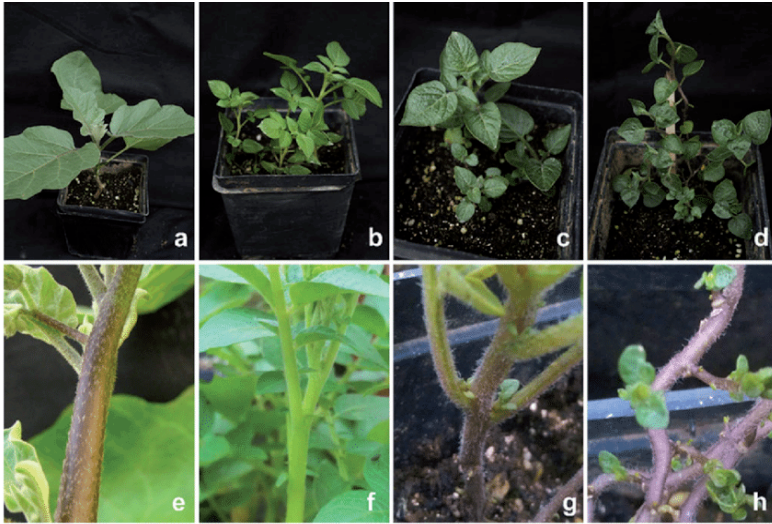
Setelah sel hibrida somatik diregenerasikan, tanaman hibrida harus diverifikasi melalui pengamatan terhadap kontribusi genetik dari kedua tanaman tetua. Beberapa cara yang dapat dilakukan untuk memverifikasi tanaman hibrida somatik adalah:

- Pengamatan morfologi
- Analisis isoenzim
- Pengamatan kromosom
- Pengamatan menggunakan teknik molekular

## A. PENGAMATAN MORFOLOGI

Tanaman hasil hibrida somatik membawa karakter dari kedua tetua atau terkadang mereka memiliki karakter yang merupakan campuran (*intermediate*) dari kedua tetuanya (Polzerová et al. 2011). Karakter-karakter tersebut tersebut dapat berupa ukuran daun, permukaan

daun, pigmen, bentuk bunga, karakter serbuk sari, dll. Misalnya, karakter intermediat bentuk morfologi daun tanaman kentang dan batang tanaman terong diamati dari hasil fusi protoplas dari kedua tanaman tersebut (**Gambar 17**).



**Gambar 17**

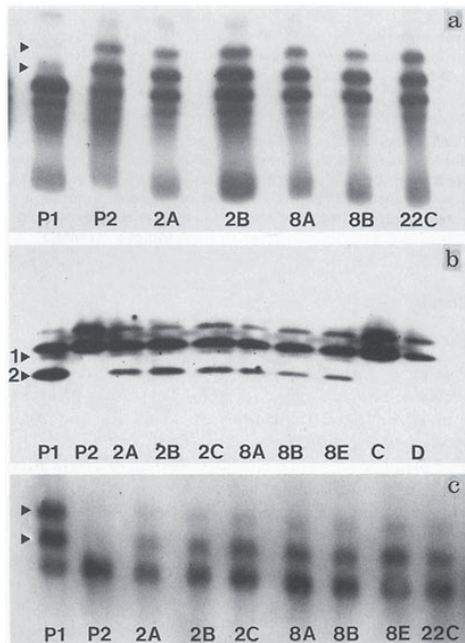
Morfologi tanaman hibrida somatik dan kedua tetua. a) dan e) Morfologi tetua fusi tanaman terong *S. melongena*; b) dan f) Morfologi tetua fusi tanaman kentang *S. tuberosum*; c-d) dan g-h) Morfologi tanaman hasil hibrida somatik yang memiliki daun seperti tanaman kentang dan batang yang berwarna ungu dan berambut seperti pada tanaman terong. Sumber: Yu et al. (2013)

## B. ANALISIS ISOENZYME

Pola pita elektroforetik dari isoenzim telah banyak digunakan untuk memverifikasi tanaman hibrida. Hibrida somatik dapat menampilkan pita isozim dari enzim spesifik tertentu dari kedua tetua atau terkadang jenis pita yang baru. Enzim yang sering banyak digunakan untuk analisis isoenzim pada tanaman hasil hibrida somatik seperti enzim esterase, isoperoxidase, fosfatase, alkohol dehidrogenase, dll. Seperti yang diamati dalam penelitian yang dilakukan oleh Waara et al. (1989), segregasi pola pita isozim dari tanaman hibrida somatik merupakan kombinasi dari pola pita isozim kedua tetua fusi dari beberapa jenis analisis isoenzim yang dilakukan (**Gambar 18**).

**Gambar 18**

Analisis isozim dari daun tanaman kentang hasil hibrida somatik, beserta parental (tetua) dan tanaman protoklon. a. Pola isozim dari fosfoglukosa isomerase; b. Pola isozim dari esterase; c. Pola isozim dari isocitrat dehydrogenase. Tetua: P1 = klon 198; 2; P2 = klon 67: 9; Tanaman hibrida somatik: 2A, 2B, 2C, 8A, 8B, 8C, 8C, 22C; Tanaman protoklon dari 67: 9: C dan D. Sumber: Waara et al. (1989)

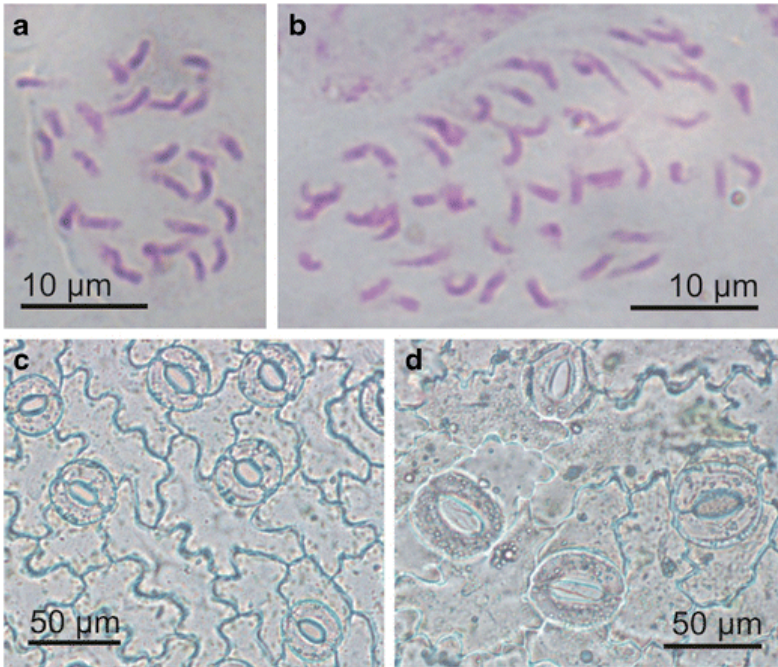




## C. PENGAMATAN KROMOSOM

Menghitung jumlah kromosom adalah metoda deteksi yang dianggap paling andal dan mudah untuk mengevaluasi apakah tanaman tersebut merupakan hasil hibrida somatik. Secara sitologis jumlah kromosom harus merupakan jumlah dari kedua jumlah kromosom tetuanya. Jika fusi protoplas terjadi pada kedua sel yang sama sehingga menghasilkan tanaman autotetraploid, maka jumlah kromosom hasil fusi adalah dua kali lipat jumlah kromosom sel induk dengan ukuran stomata yang jauh lebih besar (Tomiczak et al. 2014) (**Gambar 19**). Selain jumlahnya, ukuran dan struktur kromosom kedua tetua juga dicatat untuk verifikasi tanaman hibrida somatik.

Melalui perkembangan ilmu sitologi, yaitu pewarnaan kromosom berupa hibridisasi insitu/*in situ hybridization* (ISH), pengamatan kromosom untuk memverifikasi tanaman hasil hibrida somatik menjadi lebih mudah. Hibridisasi insitu dapat digunakan untuk mengidentifikasi sekuen, kromosom, segment kromosom yang spesifik atau seluruh set kromosom dalam gambaran yang mudah dilihat dan baik dari warna pendaran yang dihasilkan (Kato, et al. 2005).



**Gambar 19**

Penghitungan kromosom dan karakteristik stomata dari tanaman *G. decumbens*. Kromosom pada tahapan metafase dari mitosis pada sel ujung akar tanaman induk turunan benih dengan jumlah kromosim  $2n=26$  (a); Kromosom dari regeneran hasil fusi protoplas dengan jumlah kromosom  $4n=52$  (b); Stomata dari benih tanaman induk (c); Stomata tanaman regeneran auto tetraploid hasil fusi protoplas (d).

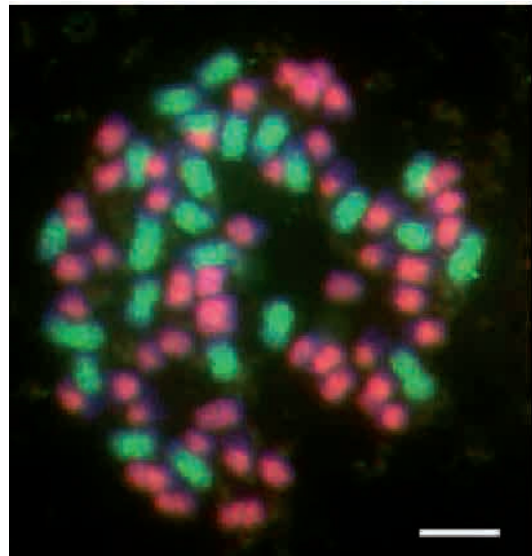
**Sumber:** Tomiczak et al. 2014

Metode ISH secara luas digunakan dalam teknik sitogenetika sebagai metode langsung untuk membedakan genom tetua dan menganalisis organisasi genom pada hibrida interspesifik, spesies allopoloid, introgesi interspesifik. Pada penelitian yang dilakukan oleh Yu et al. (2013) yang melakukan fusi protoplas antara tanaman terong (*Solanum melongena*,  $2n = 2x = 24$ ) dan tanaman kentang (*Solanum tuberosum*,  $2n = 2x = 24$ ), untuk mengintegrasikan karakter ketahanan terhadap layu bakteri dari tanaman terong ke kentang. Analisis terhadap tanaman hibrida hasil fusi dilakukan dengan menggunakan Genome Insitu Hybridization (GISH) (**Gambar 20**). Melalui perbedaan warna kromosom yang dihasilkan, yaitu warna merah untuk kromosom kentang dan warna hijau untuk kromosom tomat, pada gambar tersebut dengan jelas dapat diamati bahwa tanaman hibrida somatik yang diamati adalah tanaman hexaploid dengan komposisi kromosom kentang dan terong adalah 2:1, dengan total jumlah kromosom adalah 72.

### Gambar 20

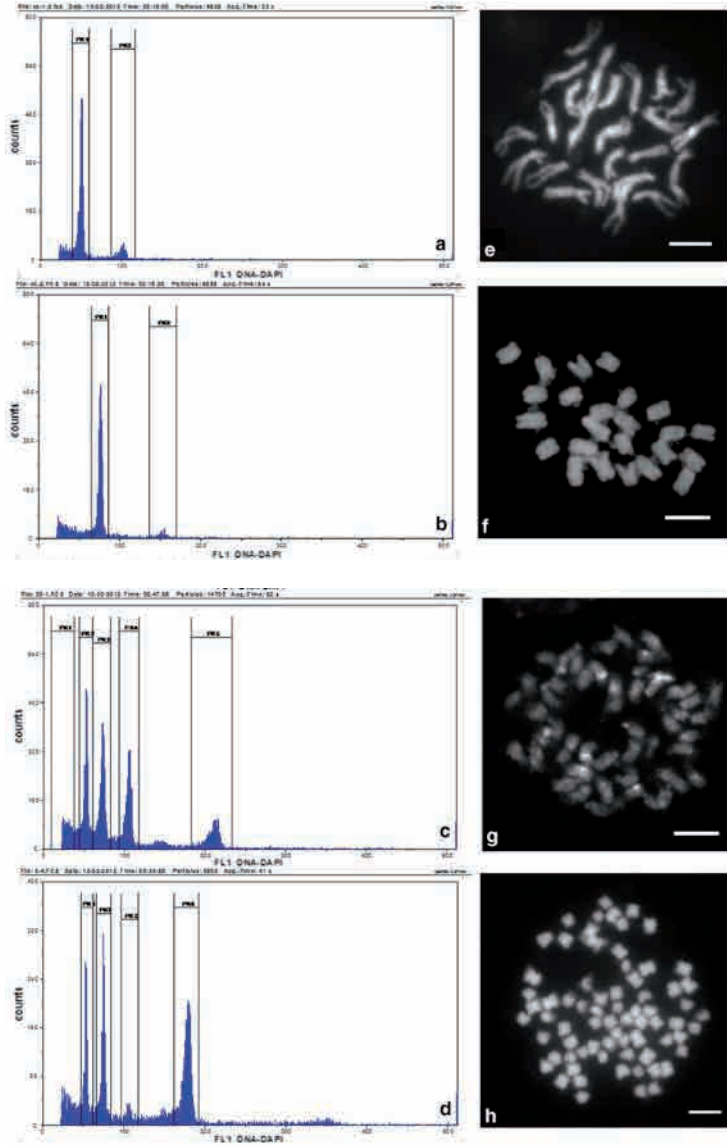
Analisis GISH dari kromosom pada waktu mitosis pada hibrida somatik dari tetua fusi *S. melongena* dan *S. tuberosum*. Hibrida somatik yang diamati mewakili komposisi kromosom *S. tuberosum* berwarna merah dan mewakili *S. melongena* berwarna hijau dengan perbandingan 2:1. Bar=5 Im.

**Sumber:** Yu et al. (2013)



Selain pengamatan jumlah kromosom secara sitologi, pengamatan jumlah kromosom tanaman hasil fusi juga bisa dilakukan melalui analisa dengan menggunakan flowcytometry (**Gambar 21**). Flowcytometry dapat digunakan untuk melihat status ploidi tanaman dan menduga jumlah kromosom yang dimiliki oleh tanaman (Nurhasanah, 2011).

Flow cytometry adalah mikroskop berfluoresensi yang menganalisis pergerakan partikel dalam suspensi menggunakan sumber cahaya berupa (UV atau laser). Prinsip dari analisis ini adalah, setiap sel yang melewati berkas sinar laser akan menyebabkan sinar laser terpecah oleh fluorokrom yang digunakan untuk mewarnai sel dengan penanda fluoresens (dalam hal ini yang ditandai adalah DNA genomik dari sel, karena cairan fluoresens yang digunakan berupa pewarna DNA). Cahaya pertama-tama diserap dan kemudian dipancarkan dalam pita panjang gelombang. Sinyal-sinyal itu dikonversikan menjadi angka digital dan diperlihatkan pada suatu histogram yang dapat dianalisis untuk memperoleh informasi tentang karakteristik dari sel bersangkutan (Ochatt, 2008).



### Gambar 21

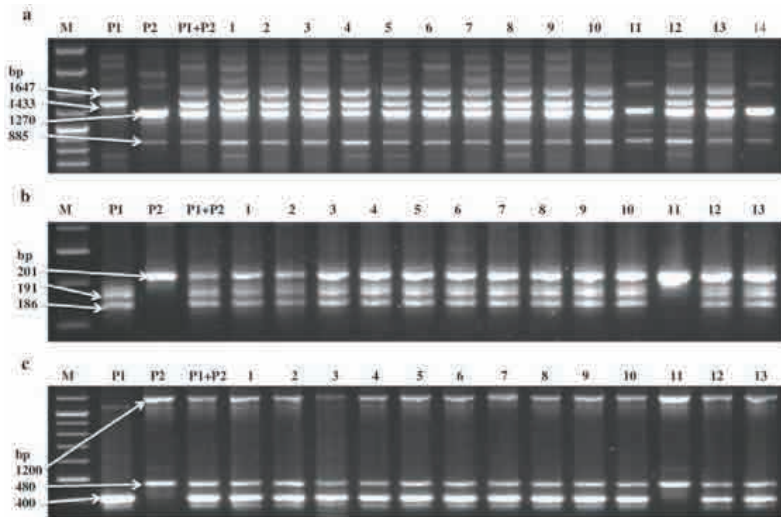
Analisis ploidy hibrida somatik dengan menggunakan flowcytometry. a-d Hasil analisis flowcytometry; e-h. Penghitungan kromosom pada saat mitosis yang menunjukkan tingkat ploidi tanaman: a,e). Tanaman kentang diploid tetua fusi *S. tuberosum*  $2n=24$ ; b-f). Tanaman terong diploid tetua fusi *S. melongena*  $2n=24$ ; c-g). Tanaman hibrida somatik  $2n=48$ . d-h) Tanaman hibrida somatik  $2n=72$ .

**Sumber:** Yu et al. (2013)

Analisis menggunakan flowcytometry untuk mengetahui ploidi dari suatu sel, secara teknis dapat dilakukan dengan mencacah halus jaringan daun tanaman menggunakan pisau skalpel di dalam larutan buffer ekstraksi (CYSTAIN DNA 2 Kit, Partec, Germany) dan larutan pewarna/staining DNA (DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole). Kemudian ekstrak yang sudah disaring (menggunakan filter nylon berukuran 30  $\mu\text{m}$ ) untuk memisahkan debris. Filtrat kemudian dideteksi kandungan DNA-nya dengan mengamati pola dari puncak (*peak*) dari histogram yang dihasilkan.

## D. TEKNIK MOLEKULER

Dengan berkembangnya teknik penanda molekuler seperti RFLP, AFLP, RAPD, microsatellites, dan lain-lain, identifikasi hibrida somatik menjadi lebih mudah. Teknologi PCR dari genom tanaman dapat digunakan untuk identifikasi tanaman hasil hibrida. Pola restriksi yang spesifik dari kloroplas dan mitokondria DNA juga telah digunakan untuk mengkarakterisasi tanaman hibrida somatik (Sarkar et al. 2011). Verifikasi tanaman hibrida somatik ditunjukkan oleh segregasi pola pita DNA dari kedua tetuanya (**Gambar 22**).



**Gambar 22**

Profil pita DNA yang dihasilkan dengan menggunakan primer RAPD (a); primer SSR (b); primer mitokondria (c). M= Marker (*Ladder*); P1= Tetua fusi *Solanum tuberosum* L; P2= *S. pinnatisectum* Dun; 1-14) regeneran hasil fusi yang diverifikasi.

**Sumber:** Sarkar et al. 2011

Pada **Gambar 22** terlihat hasil verifikasi dari tanaman regeneran hasil fusi antara tetua tanaman *Solanum tuberosum* L dan *Solanum pinnatisectum* Dun. Regeneran hasil fusi yang merupakan tanaman hibrida somatik adalah tanaman yang memiliki pola pita DNA gabungan dari kedua tetua seperti yang terlihat pada regeneran nomor 1-10, 12 dan 13. Sedangkan pada tanaman regeneran nomor 11 dan 14 bukanlah regeneran hasil fusi antara kedua tetua *S. tuberosum* dan *S. pinnatisectum*, karena

hanya memiliki pola pita dari *S. pinnatisectum* baik berdasarkan marka RAPD (**Gambar 22A**), maupun berdasarkan marka SSR (**Gambar 22 B**), dan amplifikasi genom mitokondria (**Gambar 22 C**).





# FUSI SIMETRIS DAN FUSI ASIMETRIS

Hasil dari fusi protoplas dapat berupa fusi yang simetris atau fusi asimetris. Istilah fusi simetris dan asimetris ini mengacu pada konstitusi genom inti dari produk fusi, yaitu tergantung pada kontribusi genetik dari mitra fusi atau tetua fusi (**Gambar 23**).

## A. FUSI SIMETRIS

Fusi simetris didapat dengan menggabungkan dua jenis genom sehingga diperoleh hasil yang bersifat antara (intermediate). Hibrida simetris didefinisikan sebagai hasil fusi yang memiliki set kromosom lengkap dari kedua tetuanya (Negrutiu et al. 1989).

Dalam fusi simetris, genom lengkap dari kedua protoplas induk menyatu pada sel hasil fusi yang disebut hibrida. Namun menurut Eeckhaut et al (2006), ketika dua genom lengkap bergabung, sebuah fenomena yang disebut “konflik gen” dapat muncul, karena kromosom tertentu saling tolak. Selain itu, dalam fusi protoplas yang simetris, sejumlah besar materi genetik yang tidak diinginkan

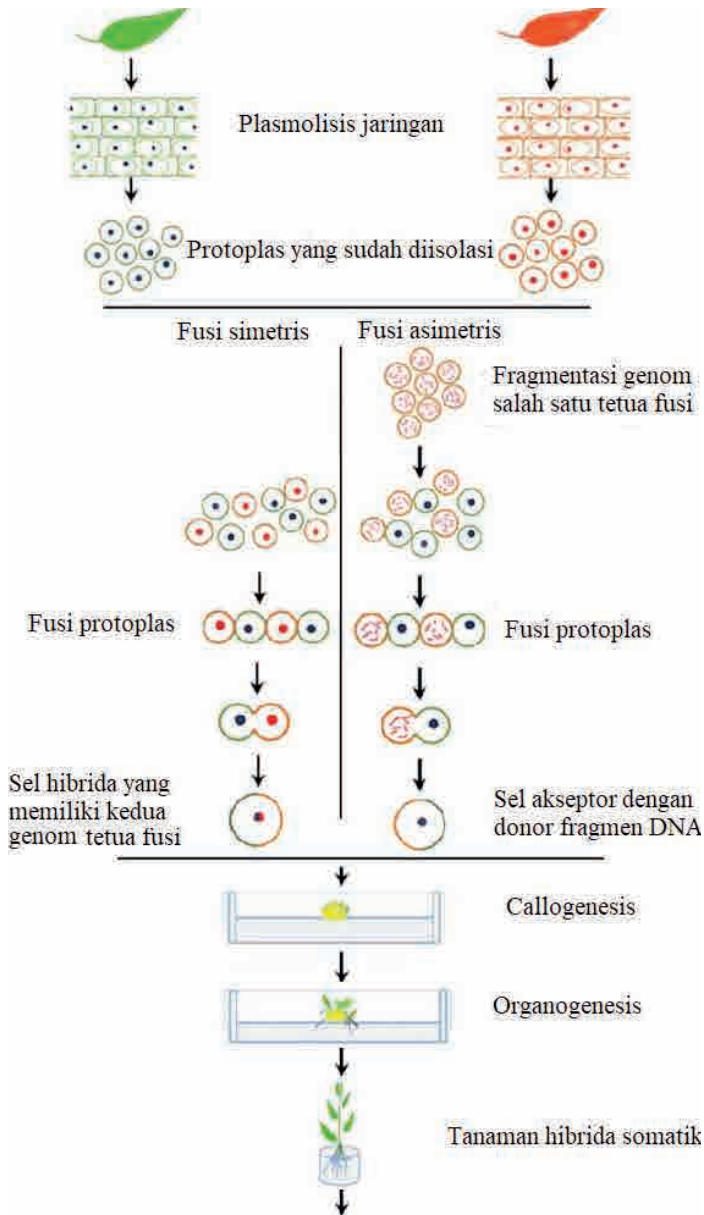
juga ikut bergabung kedalam sel hibrida. Keterbatasan ini terkadang dapat menghasilkan pertumbuhan yang abnormal, regenerasi hibrida dengan tingkat kesuburan yang rendah, tunas tidak mampu berakar, pertumbuhan hibrida lambat, dan kalus atau mikrokalus yang membandel atau tidak berdiferensiasi.

## B. FUSI ASIMETRIS

Fusi asimetris adalah hasil fusi yang kehilangan kromosom salah satu dari tetua fusi. Fusi asimetris ini didapat dengan cara sebagian genom inti salah satu tetua dihilangkan atau difragmentasi (melalui iradiasi) dan / atau tetua yang lain dihilangkan sitoplasmanya dengan iodoasetomide. Hasil fusi asimetris umumnya disebut dengan nama cybrid. Hasil fusi asimetris dapat juga terjadi karena adanya eliminasi kromosom secara spontan pada beberapa fusi antara spesies yang jarak genetiknya agak jauh.

Dalam fusi asimetris, proses fragmentasi genom dilakukan untuk menghilangkan/mengeliminasi sebagian besar dari material genetik tetua donor, atau menghasilkan potongan-potongan kecil dari genom tanaman donor. Hanya sejumlah kecil dari genom yang difragmentasi tersebut yang terintegrasi kedalam produk fusi / sel akseptor (**Gambar 23**).

Sebagian besar ketidakstabilan kariotipe yang diakibatkan oleh adanya potongan-potongan gen donor yang terdapat didalam sel hasil fusi akan hilang selama proses mitosis pertama setelah terjadinya fusi. Sebaliknya, dalam fusi simetris gen dari tanaman donor yang tidak diinginkan akan terus terbawa hingga keturunan generasi pertama dari hasil persilangan seksual dan baru dapat dihilangkan melalui silang balik berulang kali terhadap tetua akseptor. Dengan kata lain,



**Gambar 23**

Fusi asimetris (cybrid) dan fusi simetris (hybrid). Sumber: Shankar et al (2013), dengan modifikasi minor.

fusi asimetris tidak hanya mengintroduksi atau memasukkan lebih sedikit gen dari sel donor kedalam, tetapi dapat menghilangkan gen atau kromosom yang tidak diinginkan lebih cepat.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Zhou et al (2001), fusi simetris dan fusi asimetris dilakukan pada protoplas yang berasal dari suspensi sel dari tanaman gandum *Triticum aestivum* (cv. Jinan 177) dan protoplas tanaman *Haynaldia villosa* yang berasal dari kalus embriogenerik berumur satu tahun. Kalus tanaman *Haynaldia villosa* sebagai salah satu sumber protoplas dalam penelitian ini diradiasi dengan sinar gamma pada dosis 40, 60, 80 Gy (1,3 Gy / menit). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman hibrida somatik hasil fusi simetris didapatkan dari protoplasma yang berasal dari kalus yang diradiasi dengan sinar gamma pada dosis yang rendah. Sedangkan fusi asimetris didapatkan dari protoplas yang berasal dari kalus yang diradiasi dengan sinar gamma pada dosis tinggi. Persentase fusi asimetris meningkat dengan meningkatnya dosis sinar gamma yang diberikan.

Fusi asimetris biasanya dilakukan untuk mentransfer atau mengintroduksi gen tertentu yang diinginkan dari tanaman liar ke dalam varietas komersial. Tanaman hibrida dengan translokasi fragmen kecil dari DNA yang membawa sifat yang bermanfaat dalam bidang pemuliaan tanaman dapat diperoleh secara langsung dengan fusi asimetris. Teknik ini juga dapat digunakan sebagai alternatif yang lebih cepat untuk mengembalikan genom tetua komersial. Dengan introgresi gen dalam jumlah yang kecil pada fusi asimetris akan mempermudah proses reduksi genom dari tanaman donor yang tidak diinginkan sehingga jumlah *backcross* (silang balik) terhadap tetua komersial atau tanaman akseptor juga dapat dikurangi secara signifikan, dibandingkan dengan hasil persilangan seksual/secara konvensional atau hasil dari fusi simetris.

Teknik fusi asimetris juga diterapkan untuk menghindari hambatan yang terjadi dalam fusi simetris. Sebagai contoh, hibrida simetris antara *Brassica napus* dan *Lesquerella fendleri* adalah tanaman yang infertil atau mandul, sedangkan hasil fusi asimetris dari kedua tanaman tersebut adalah tanaman yang fertil. Demikian pula, fusi simetris antara *Orychophragmus violaceus* dan *Brassica napus* menghasilkan hibrida steril, sedangkan hibrida asimetris adalah tanaman yang fertil dan dapat menghasilkan biji (Hu et al. 2002). Rekombinasi antara genom sitoplasma dengan genom inti tertentu juga dapat dilakukan untuk perakitan tanaman mandul jantan sitoplasma atau *cytoplasmic male sterility* (CMS).

Proses fragmentasi dari genom donor pada fusi asimetris dapat dilakukan dengan beberapa teknik diantaranya melalui: iradiasi, mikroprotoplas, atau inhibitor metabolik seperti iodoacetamide.

## 1. Iradiasi

Fragmentasi genom dengan iradiasi dapat dilakukan dengan menggunakan teknik radiasi ionisasi (sinar X dan sinar gamma) atau radiasi non ionisasi (sinar UV). Iradiasi sering menginduksi kerusakan kromosom acak, tetapi dapat juga mengakibatkan penghilangan (delesi) gen atau penataan ulang gen, serta dapat mengakibatkan kemandulan. Menurut Shankar et al. (2013), aplikasi pertama sinar-X untuk mendapatkan hibrida asimetris dilakukan pada tanaman peterseli (Dudit et al. 1980). Sedangkan sinar UV pertama kali digunakan untuk membuat hibrida asimetris pada protoplas donor dari tanaman tembakau (Dimanov dan Atanassov 1989). Sebelumnya, sinar X atau sinar gamma lebih sering digunakan untuk fragmentasi protoplas donor, tetapi saat ini sinar UV lebih banyak

digunakan untuk fragmentasi DNA pada fusi protoplas. Kedua jenis iradiasi tersebut secara efisien dapat menginduksi terjadinya hibrida somatik asimetris tergantung dari dosis yang digunakan.

Hall et al. (1992) melaporkan bahwa radiasi non ionisasi dengan menggunakan sinar UV memiliki efek merusak pada protoplas tanaman bit gula, mengganggu pembentukan dinding sel, serta mengganggu pertumbuhan dan pembelahan sel. Viabilitas protoplas tidak menurun setelah kultur 6 hari, tetapi setelah 14 hari, sel yang diperlakukan dengan sinar UV mengalami kematian. Hal yang sama juga diamati pada penelitian yang lain. Pada tanaman mentimun, efek negatif dari iradiasi UV diamati mengganggu regenerasi dinding sel, menurunkan viabilitas protoplas dan intensitas nukleus. Di sisi lain, keuntungan signifikan dari radiasi UV dibandingkan radiasi ionisasi (seperti sinar X dan sinar gamma) adalah aplikasi yang lebih mudah dan reproduktifitas tinggi.

Walaupun dalam fusi asimetris fragmentasi genom umumnya dilakukan dengan iradiasi genom tanaman donor, akan tetapi dalam beberapa kasus fusi asimetris dapat dilakukan tanpa proses fragmentasi genom. Produksi hibrida asimetris dengan cara ini dilakukan untuk mengurangi kemungkinan efek iradiasi jangka panjang pada pertumbuhan dan perkembangan tanaman hasil fusi (Shankar et al. 2013).

## **2. Transfer Kromosom yang Dimediasi oleh Microprotoplast.**

Selain iradiasi protoplas donor, kromosom transfer yang dimediasi oleh mikronukleus dan mikroprotoplas (*micronuclei and microprotoplasts mediated chromosome transfer / MMCT*) dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk mentransfer genom secara parsial dalam fusi asimetris (Shankar et al. 2013).

Induksi mikronukleasi dan isolasi sel mikro secara massal yang efisien adalah langkah kunci dalam keberhasilan transfer genom parsial. Seperti yang telah diketahui, mikrotubulus terlibat dalam beberapa proses di dalam sel, seperti migrasi kromosom, struktur sel, pengaturan mikrofibril selulosa, pembentukan dinding sel, pergerakan intraseluler dan diferensiasi sel. Beberapa senyawa toksik seperti herbisida antimitosis (yang mengganggu proses mitosis/pembelahan sel) atau kolkisin akan mencegah polimerisasi normal dari mikrotubulus. Pemberian senyawa toksin tersebut terhadap mikrotubulus (benang gelendong) akan memblok sel-sel pada kondisi metafase dan mengganggu (mencerai-beraikan) sebaran kromosom dalam sitoplasma; dan selanjutnya kromosom terkondensasi menjadi mikronukleus-mikronukleus. Sel-sel mikronukleus ini apabila dihilangkan dinding selnya akan menghasilkan mikroprotoplas. Mikroprotoplas yang dihasilkan dapat disentrifugasi untuk memisahkan mereka ke dalam kelompok ukuran tertentu, kemudian disaring dengan menggunakan filter secara berurutan mulai dari filter yang memiliki pori-pori yang lebih kecil. Beberapa contoh suspensi sel dari mikroprotoplas yang pernah diterapkan adalah pada tanaman jeruk *Citrus unshiu* (Zhang et al. 2006) dan tanaman bit *Beta vulgaris* (Famelaer et al. 2007).

Selain dari perbedaan jenis toksin mikrotubulus yang digunakan, dosis, periode inkubasi dan genotipe tanaman juga akan mempengaruhi efisiensi dari teknik mikronukleus ini. Parameter-parameter tersebut dapat dioptimalkan, seperti pada tanaman *Spathiphyllum wallisii* (Lakshmanan et al. 2013), indeks mikronukleus tertinggi diperoleh setelah perlakuan mikrospora dengan 10  $\mu\text{M}$  oryzalin selama 72 jam atau 20  $\mu\text{M}$  chlorpropham selama 48 jam. Jumlah maksimal mikronukleus yang diamati adalah 12, sedangkan jumlah kromosom haploid berjumlah 15. Oryzalin adalah inhibitor mitosis yang paling banyak digunakan, tetapi efisiensinya bervariasi tergantung pada spesies tanaman.



### 3. Inaktivasi sitoplasma

Inhibitor metabolik, seperti iodoasetamide dan rhodamin 6-G dapat digunakan untuk mendapatkan fusi asimetris (Shankar et al. 2013). Cara kerja iodoasetamide belum dapat dideskripsikan secara jelas. Senyawa ini menghambat pembelahan protoplas dengan menonaktifkan sitoplasma. Pada protoplasma dari sel mesofil tanaman sawi putih *chicory*, pembelahan protoplas dihambat setelah diinkubasi dengan 2 - 4 mM iodoacetate. Ketika menggunakan iodoasetamide, konsentrasi optimal yang digunakan dapat lebih rendah, yaitu 1,625 mM. Konsentrasi iodoasetamide optimal yang lebih rendah dibandingkan dengan iodoasetat dikarenakan penetrasi sel iodoasetamide lebih baik dibandingkan dengan iodoasetat. Konsentrasi iodoasetamide yang lebih rendah (0,5 mM) juga diamati dapat menghentikan pertumbuhan protoplas tanaman kapas *Gossypium hirsutum*, sedangkan konsentrasi iodoasetamide 3 mM dapat menghentikan proliferasi sel dalam tanaman jeruk *Citrus Sp* (Bona et al. 2009).

Penggabungan protoplas tetua akseptor yang diterapi dengan iodoasetamide dengan protoplas tetua donor yang diiradiasi dapat menghasilkan sel cybrid. Salah satu contoh fusi protoplas asimetris yang berhasil dilakukan menghasilkan sel cybrid adalah fusi antara bunga matahari yang mandul jantan dengan tanaman sawi putih fertil (Varotto et al. 2001). Protoplas dari sel hipokotil tanaman bunga matahari diradiasi dengan menggunakan sinar- $\gamma$ , sedangkan protoplas dari sel mesofil sawi putih (*chicory*) diinkubasi dengan iodoacetate. Hasil dari fusi protoplas kedua tanaman tersebut menghasilkan tanaman mandul jantan sitoplasma. Analisis sitologi dari sel-sel akar tanaman hasil fusi menunjukkan bahwa sebagian besar dari tanaman memiliki jumlah kromosom 18, yaitu sama dengan jumlah

kromosom tanaman sawi putih. Tiga tanaman hasil fusi memiliki sitoplasma yang asimetris antara bunga matahari dan sawi putih, satu tanaman menghasilkan pola sitoplasma baru yang tidak terdeteksi pada salah satu tetua. Tanaman cybrid yang dihasilkan dari penelitian ini memiliki fragmen DNA fertil dari sawi putih dan mandul jantan sitoplasma dari bunga matahari. Morfologi tanaman cybrid memiliki fenotip yang mirip dengan tanaman sawi putih, dan pada saat bunga mekar, serbuk sari yang dihasilkan lebih sedikit. Serbuk sari tersebut tidak bisa berkecambah baik secara invitro maupun invivo (steril). Tumbuhan cybrid yang ditanam di lapangan baru dapat menghasilkan biji ketika terjadi penyerbukan bebas (*outcrossing*).

Perlakuan Iodiasetamide pada protoplas akan mencegah pembelahan sel, tetapi selanjutnya hasil fusi protoplas yang diinkubasi dengan senyawa non-iodiasetamide akan mengembalikan kemampuan pembelahan sel, sehingga dapat terjadi fusi heterokaryon atau cybrid.

Teknik fusi asimetris telah banyak diterapkan, terutama pada family Brassicaceae, Poaceae, dan Rutaceae. Hibridisasi asimetris ini lebih banyak dilakukan dengan menggunakan PEG dibandingkan dengan fusi listrik/elektrofusi. Fusi asimetris memungkinkan terjadinya rekombinasi genom baru yang sulit atau tidak mungkin dilakukan melalui fusi simetris klasik atau persilangan seksual.

Fusi asimetris banyak diterapkan untuk tujuan pengembangan resistensi tanaman terhadap cekaman biotik, peningkatan variasi genetik, perbaikan sifat agronomis seperti buah tanpa biji, analisis hibrida, dan produksi metabolit sekunder. Tujuan lain yang juga bisa diterapkan melalui fusi asimetris adalah resistensi tanaman terhadap cekaman abiotik, hibridisasi, pemetaan genom dan pembentukan galur dengan penambahan kromosom (chromosome addition lines) (Shankar et al. 2013).

Sumber protoplas akseptor untuk hibridisasi asimetris terutama berasal dari kultur suspensi sel, sel mesofil, kalus dan hipokotil. Pada family Brassicaceae dan Asteraceae protoplas akseptor berasal dari sel hipokotil yang dikombinasikan dengan protoplas donor dari sel mesofil.

# **APLIKASI FUSI PROTOPLAS DAN PEMANFAATANNYA DALAM PEMULIAAN TANAMAN**

Penelitian fusi protoplas telah menghasilkan hibrida-hibrida somatik yang mempunyai sifat-sifat yang penting antara lain tahan terhadap hama dan penyakit, produktivitas tinggi, dan sifat-sifat kualitatif yang lebih baik, seperti kandungan minyak tinggi. Berikut adalah beberapa contoh keberhasilan aplikasi teknik fusi protoplas untuk memperbaiki sifat-sifat tanaman.

## **A. MENGATASI HAMBATAN / INKOMPATIBILITAS GENETIK DALAM PERSILANGAN KONVENSIONAL**

Fusi protoplas menawarkan peluang untuk mengatasi hambatan-hambatan terutama masalah inkompatibilitas genetik dalam reproduksi seksual atau persilangan konvensional. Umumnya dalam persilangan konvensional, keberhasilan persilangan konvensional

terjadi apabila organisme yang disilangkan berasal dari spesies yang sama. Semakin jauh kekerabatan genetik tanaman, semakin besar peluang inkompatibilitas tanaman. Hal ini mengakibatkan sulit atau tidak memungkinkannya dilakukan persilangan pada tanaman yang berbeda genus atau family. Hal ini menjadi mungkin dengan adanya fusi protoplas. Hibridisasi somatik dapat dilakukan pada tanaman yang berbeda spesies seperti antara tanaman terong dan kentang (Yu et al. 2013). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Kao dan Chatterjee (1988) juga menunjukkan keberhasilan fusi intergenera antara tanaman *Brassica juncea* dan *Diplotaxis muralis*, yang tidak mungkin dilakukan melalui persilangan konvensional.

## **B. PENINGKATAN KERAGAMAN GENETIK**

Sumbangan yang nyata dari penelitian-penelitian hibridisasi somatik menggunakan teknik fusi protoplas adalah dalam produksi hibridisasi intergenera yang secara genetik kekerabatannya cukup jauh dan tidak memungkinkan untuk dilakukan persilangan secara konvensional, sehingga dapat meningkatkan keragaman genetik tanaman (Wang et al. 2006).

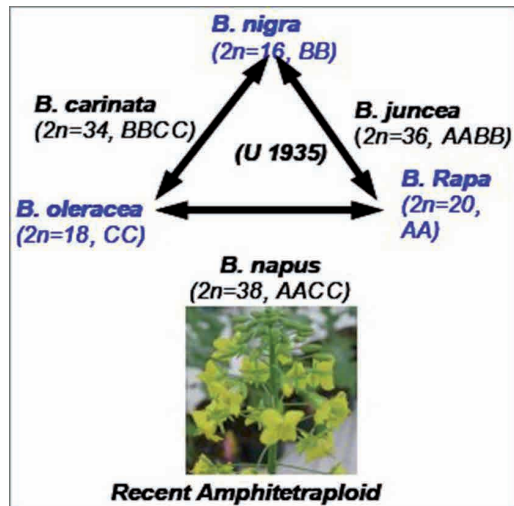
Teknik fusi protoplas juga dapat diaplikasikan untuk mengatasi masalah penurunan kemampuan regenerasi tanaman dan kehilangan kromosom, seperti yang telah diaplikasikan dalam produksi hibrida somatik antara tanaman gandum dan *Haynaldia villosa*, dimana protoplas gandum berfungsi sebagai resipien dan protoplas *H. villosa* sebagai donor. Gen-gen yang didonorkan oleh tanaman *H. Villosa* ini dimanfaatkan untuk pengembangan tanaman gandum (Zhou et al. 2001).

## C. MENGHASILKAN SPESIES TANAMAN BARU

Aplikasi teknik hibrida somatik ini juga dimanfaatkan dalam produksi tanaman hibrida intergenera yang cukup penting yaitu hibrida antar genus *Brassicaceae* (Harms 1992). Seperti diketahui, hibrida antar genus yang terjadi secara alami dari tanaman *Brassicaceae* dengan genom yang berbeda yang dikenal dengan *allopolyploidy* dapat menghasilkan spesies baru yang berperan penting secara ekonomi dibidang pertanian. Seperti spesies *Brassica napus* L. yang merupakan tanaman penghasil minyak biji utama di beberapa wilayah subtropis, seperti China, Kanada dan Eropa. *B napus* ( $2n=38$ , AACC) merupakan tanaman amphidiploid hasil hibridisasi spontan antara *B. rapa* ( $2n=20$ , AA) and *B. oleracea* ( $2n=18$ , CC) (**Gambar 24**).

**Gambar 24** —————

Allopolyploidy yang menghasilkan spesies baru dari persilangan secara alami antara *B. rapa* ( $2n=20$ , AA), *B. Nigra* ( $2n=16$ , BB) dan *B. oleracea* ( $2n=18$ , CC).



Melalui teknik fusi protoplas atau hibrida somatik tanaman *B. carinata*, *B. juncea* dan *B. napus* dapat diproduksi dengan menggabungkan protoplas dari kedua tanaman tetua yang berbeda spesies (Uddin, 2014).

## D. KETAHANAN TERHADAP HAMA DAN PENYAKIT

Hibridisasi somatik menggunakan teknik fusi protoplas dapat mengintroduksi gen-gen yang menyandikan sifat ketahanan tanaman terhadap penyakit yang berasal dari spesies-spesies liar (Collonnier et al. 2003).

Beberapa hibrida inter spesies dan inter genera berhasil didapatkan melalui teknik fusi protoplas pada famili Solanaceae (Puite 1992), yaitu hibridisasi somatik antara spesies *Nicotiana tabacum* and *N. rustica*, yang berhasil mendapatkan tanaman tembakau yang memiliki kandungan nikotin dan tar yang bervariasi dan mempunyai ketahanan terhadap penyakit *blue mould* dan *black root rot* (Drew 1993).

Masih dalam famili solanaceae, hibrida somatik yang dilakukan antara tanaman terong *Solanum melongena*, dan kerabat liarnya *S. sisymbriifolium* ditinjau sebagai suatu cara yang cukup efektif dalam mentransfer ketahanan terhadap nematoda dan *mite* kedalam tanaman terong (Handley and Kumashiro 1986). Hibrida antara kedua spesies tersebut sangat sulit untuk didapatkan melalui persilangan secara seksual biasa.

Selain pada famili solanaceae, ketahanan terhadap penyakit yang ditransfer dari kerabat liar kedalam varietas budidaya melalui fusi protoplas juga diaplikasikan pada tanaman *rapeseed*, kentang, *Allium*

spesies, citrus, ketimun, melon, alfalfa, padi dan gandum (Harms 1992). Umumnya sifat ketahanan tanaman terhadap penyakit banyak dimiliki oleh kerabat liarnya. Untuk mengintroduksi gen ketahanan tersebut kedalam varietas komersial melalui persilangan konvensional atau persilangan secara seksual sangat sulit dilakukan karena adanya inkompatibilitas. Oleh karena itu teknik fusi protoplas dapat diterapkan untuk mengatasi masalah inkompatibilitas tersebut.

## **E. KETAHANAN TERHADAP LINGKUNGAN ABIOTIK**

Fusi protoplas antara tanaman tomat *Lycopersicon esculentum* dan tanaman kentang *Solanum lycopersicodes* dilakukan untuk mendapatkan tanaman tomat yang toleran terhadap suhu dingin (Handley dan Kumashiro 1986).

## **F. MENDAPATKAN TANAMAN STERIL JANTAN/MALE STERIL**

Tanaman mandul jantan atau steril jantan sering didapatkan dari hasil fusi asimetris. Sifat sterilitas jantan, yang terdapat dalam sitoplasma dari tanaman *N. debneyi*, ditransfer kedalam tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*). Fusi protoplas antara tanaman tembakau dan *N. Debneyi* dilakukan dengan sebelumnya meradiasi protoplas dari *N. Debneyi* dengan sinar X untuk menghilangkan atau memfragmentasi kromosom inti dari *N. Debneyi* (Handley and Kumashiro 1986). Perlakuan sinar X tersebut akan menginaktifkan nukleus dari *N. Debneyi* tanpa merusak fungsi dari sitoplasmanya.



Fusi dari protoplasma haploid digunakan untuk mengkombinasikan mandul jantan sitoplasma (*cytoplasmic male sterility*) dan resistensi terhadap atrazine yang terdapat pada sitoplasma pada tanaman *rapeseed* (Drew 1993). Hasil fusi cybrid pada tanaman padi untuk sifat sterilitas sitoplasma jantan sangat berguna untuk produksi benih tanaman hibrida (Drew 1993). Dengan penggunaan tanaman steril jantan dalam produksi tanaman hibrida akan memudahkan proses persilangan antar tetua galur murni terpilih, karena tidak diperlukan proses emaskulasi/pembuangan anther/kelamin jantan pada bunga.

## G. MANIPULASI PLOIDI

Fusi protoplas dapat digunakan untuk memanipulasi ploidi dari tanaman. Hasil yang paling penting dari hibrida somatik ini untuk program pemuliaan adalah dalam menghasilkan tanaman tetraploid. Tanaman tanpa biji merupakan salah satu program komersial yang cukup penting terutama dalam pemuliaan tanaman buah-buahan, seperti produksi tanaman jeruk tanpa biji. Hibridisasi somatik melalui teknologi fusi dapat digunakan untuk menghasilkan kultivar elit yang diploid menjadi hibrida somatik autotetraploid (atau allotetraploid) sebagai salah satu tetua untuk disilangkan dengan tetua tanaman elit diploid lainnya dalam menghasilkan tanaman triploid tanpa biji. Pada tanaman jeruk, hibridisasi somatik melalui fusi protoplas ini digunakan untuk memproduksi tanaman allotetraploid, yang selanjutnya digunakan sebagai tetua didalam persilangan interploidi untuk menghasilkan tanaman jeruk triploid yang tidak memiliki biji (Grosser and Gmitter 2005) (**Gambar 25**).

Pada Gambar 25 tersebut, tanaman jeruk tanpa biji merupakan hibrida triploid yang dihasilkan melalui persilangan interploid yaitu persilangan dari ploidi yang berbeda. Misalnya tanaman jeruk mandarin tanpa biji triploid yang dihasilkan dengan cara melakukan fusi protoplas antara varietas ‘*Nova*’ dan ‘*Succari*’ (yang menghasilkan tanaman allotetraploid). Selanjutnya hasil fusi antara ‘*Nova*’ + ‘*Succari*’ disilangkan dengan varietas ‘*Sugar Belle*’. Metode yang sama dilakukan untuk tanaman triploid jeruk yang lain (Grosser and Gmitter, 2011).



**Gambar 25**

Contoh tanaman tanpa biji dari hibrida triploid yang dihasilkan melalui persilangan interploid dengan menggunakan hibridisasi somatik dari sel-sel polen tanaman tetua. Kiri: triploid jeruk mandarin, hasil hibridisasi somatik antara ‘*Sugar Belle*’ x ‘*Nova*’ + ‘*Succari*’; Tengah: triploid jeruk nipis, hasil hibridisasi somatik dari ‘*Todo del Ano*’ jeruk lemon x ‘*Mexican*’ jeruk nipis + ‘*Valencia*’; Kanan: triploid jeruk lemon, hasil hibridisasi somatik antara ‘*Todo del Ano*’ jeruk lemon x ‘*Hamlin*’ + ‘*Femminello*’.

**Sumber** (Grosser and Gmitter, 2011).

Hasil dari uji coba lapangan menunjukkan bahwa batang bawah yang berasal dari hibrida somatik dapat menghasilkan ukuran pohon yang tinggi dengan hasil yang berkualitas (rasa buah yang manis). Jika ditanam pada baris dan jarak pohon yang optimal, hibrida somatik dapat menghasilkan lebih dari 22 ton (20.000 kg) buah per are pada pohon yang memiliki ketinggian sekitar 3-4 m.

Walaupun saat ini tanaman autotetraploid, lebih sering dan lebih mudah jika diproduksi dengan menggunakan bahan kimia yang berfungsi sebagai agen pengganda kromosom seperti kolkisin (Nurhasanah, 2008). Namun tanaman triploid yang dihasilkan dari tetua yang allotetraploid yang dihasilkan dari hasil fusi protoplas akan memiliki lebih banyak variasi dalam keragaman genetik yang dimiliki.

## H. PRODUKSI BATANG BAWAH DALAM PENYAMBUNGAN

Pada tanaman jeruk, produksi bibit dilakukan dengan metode perbanyak vegetatif melalui penyambungan menggunakan batang bawah yang berasal dari hasil fusi protoplas/hibrida somatik. Hasil evaluasi percobaan lapangan dengan menggunakan batang bawah hasil hibrida somatik diamati terjadinya pengerdilan batang bawah dibandingkan dengan metode produksi bibit melalui *grafting* pada umumnya yaitu dengan menggunakan batang bawah yang bukan berasal dari hasil hibrida somatik.

Batang bawah dari hasil hibrida somatik menunjukkan hasil yang lebih baik pada pembibitan jeruk varietas *Flying Dragon*. Walaupun masih terdapat kelemahan pada beberapa varietas yang lain. Misalnya, hibrida somatik yang dibuat dengan galur jeruk mandarin Cleopatra, embriogenik kalus yang dihasilkan tidak memadai, jumlah

biji nuselus tidak memenuhi standar propagasi pembibitan. Hal ini mungkin disebabkan oleh terjadinya beberapa mutasi pada kalus embriogenik pada galur yang digunakan dalam produksi hibrida somatik. Hibrida yang lain seperti Hamlin, memiliki performa yang lebih baik pada awal pertumbuhan, tetapi pertumbuhan lebih lanjut di lapangan terlihat kurang baik dibandingkan dengan varietas Flying Dragon pada beberapa lokasi pengamatan, sehingga potensi lebih lanjut untuk komersialisasi menjadi kurang prospektif.

Penggunaan batang bawah dengan menggunakan jeruk nipis Rangpur menunjukkan hasil yang lebih baik. Hibrida somatik menunjukkan pertumbuhan yang sangat baik dalam uji coba di lapangan, di mana stek tanaman berakar dengan baik, dan menghasilkan buah.

## **I. PERBAIKAN SIFAT/KARAKTER TANAMAN**

Berdasarkan hasil dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, fusi protoplas berhasil dilakukan untuk memperbaiki karakter tanaman. Pada tanaman jeruk, fusi protoplas berhasil meningkatkan potensi hasil dari tanaman, meningkatkan diameter batang, menurunkan jumlah biji dari buah jeruk yang dihasilkan, dan meningkatkan kadar kemanisan dari buah (Grosser and Gmitter, 2011).

## **J. PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER**

Tanaman *Swertia tetraptera* Maxim. merupakan sumber penting glukosida sekoiridoid. Untuk menghasilkan senyawa yang bermanfaat dalam bidang farmakologi ini dilakukan fusi protoplas antara tanaman

*S. tetraptera* Maxim dan *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. Hibrida somatik dilakukan menggunakan protoplas *S. tetraptera* yang diiradiasi dengan menggunakan sinar UV dan difusikan dengan protoplas dari tanaman donor *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. Tanaman *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. merupakan tanaman yang secara sitogenetis stabil dan tumbuh cepat; serta protoplas yang diisolasi dari tanaman ini lebih mudah untuk diregenerasikan. Dari beberapa tanaman yang beregenerasi, terdapat beberapa klon yang mengandung 0,014% swertiamarin, 0,069% swertiamarin, 0,409% gentiopicroside dan 0,015% gentiopicroside. Gentiopicroside, adalah komponen aktif paling penting dari glikosida sekoiridoid, yang memiliki efek antiinflamasi, analgesik, dan antibakteri yang signifikan, serta aktivitas biologis untuk mengobati osteoarthritis dan memperkuat motilitas lambung (Cao et al. 2016). Sedangkan swertiamarin sendiri merupakan bahan aktif yang dapat merangsang pembentukan atau regenerasi epidermis dan / atau untuk merangsang metabolisme dermis sehingga sering digunakan terutama di bidang kosmetik. Bahan aktif swertiamarin juga sering dimanfaatkan untuk pengobatan obesitas, dislipidemia dan diabetes militus (Patel et al. 2013).

## **K. PERAKITAN TANAMAN DENGAN PENAMBAHAN KROMOSOM (*CHROMOSOMAL ADDITIONAL LINES*)**

Fusi protoplas dapat digunakan untuk merakit populasi galur tanaman dengan penambahan kromosom (*chromosome addition lines*) (Shankar et al. 2013). Penambahan kromosom asing (*alien additional chromosomal lines*) telah banyak digunakan untuk

mengidentifikasi keterkaitan gen, bagian dari kromosom tertentu yang bertanggung jawab terhadap karakter spesifik dari setiap spesies dan membandingkan sintesis gen antar spesies terkait. Dalam pemuliaan tanaman, hal ini dapat dimanfaatkan untuk menganalisis karakter agronomi yang dibawa oleh segmen yang terintrogressi.

Dalam penelitian yang dilakukan oleh Zhao et al. (2008), hibrida somatik intergenerik antara *Brassica napus* ( $2n = 38$ ) + *Orychophragmus violaceus* ( $2n = 24$ ) didapatkan melalui fusi asimetris dengan menggunakan protoplas dari sel mesofil. Tanaman hasil hibrida somatik menunjukkan variasi dalam morfologi dan kesuburan dan merupakan mixoploid dengan jumlah kromosom bervariasi ( $2n = 51-67$ ), dengan kisaran 19–28 adalah kromosom dari *O. violaceus* yang diidentifikasi dengan menggunakan *genomic in situ hybridization* (GISH). Selanjutnya dilakukan silang balik (*backcross*) terhadap tetua *B. napus*. Sebanyak 20 tanaman BC1 berhasil diperoleh setelah melalui proses penyelamatan embrio (*embryo rescue*). Hasil pengamatan terhadap morfologi tanaman BC1 memperlihatkan bentuk daun yang bergerigi khas *O. violaceus* atau *B. napus*. Semua tanaman BC1 sebagian bersifat jantan subur (*male fertile*) tetapi mandul betina (*female sterile*) karena ovul yang terbentuk abnormal, karena merupakan mixoploid ( $2n = 41-54$ ) dengan 9-16 kromosom dari *O. violaceus*. Tanaman BC2 menunjukkan adanya segregasi terhadap karakter kesuburan untuk bunga betina (*female*), segregasi untuk bentuk daun dan terdapat variasi dalam jumlah kromosom ( $2n = 39-43$ ) dengan 2-5 kromosom berasal dari *O. violaceus*. Di antara progeni yang menyerbuk sendiri dari tanaman BC2, terdapat galur dengan penambahan kromosom monosomik ( $2n = 39, AACC + 1 O$ ), yaitu 38 kromosom *B. napus* dan 1 kromosom *O. violaceus*, dengan atau tanpa daun bergerigi dari *O. violaceus* atau sterilitas betina (*female sterile*).

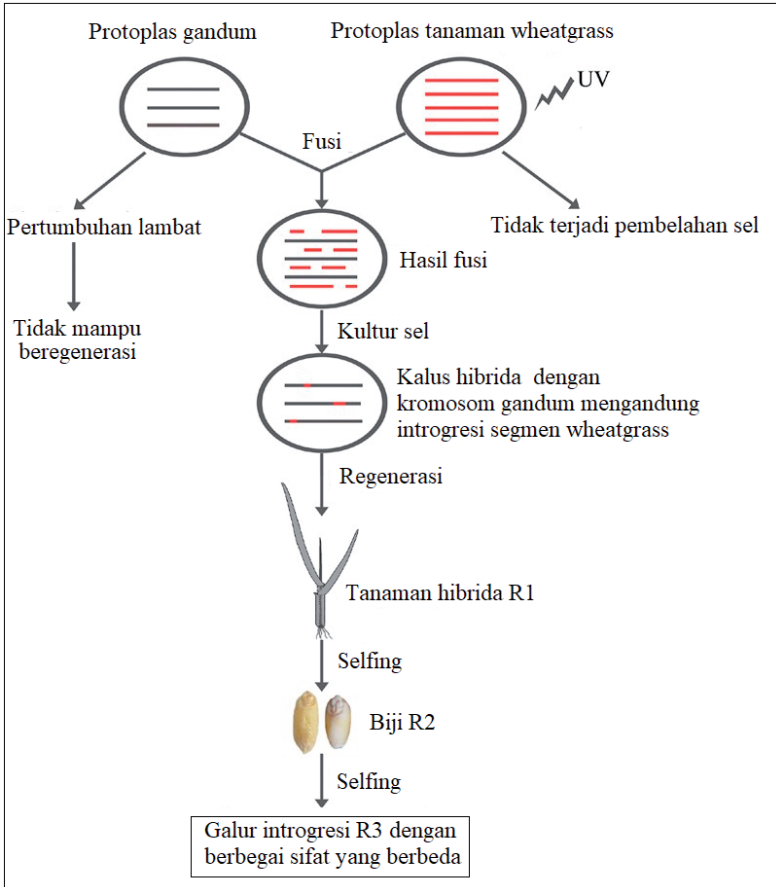
## L. PERAKITAN GALUR INTROGRESI/ SUBSTITUSI

Hibridisasi somatik asimetris gandum roti (*Triticum aestivum*) dan *wheatgrass* (*Thinopyrum ponticum* Podp) menghasilkan enam galur introgresi somatik yang stabil secara genetik. Hasil karyotyping menunjukkan keenam galur tersebut mirip dengan tetua tanaman gandum. Hasil analisis GISH mengidentifikasi adanya sejumlah segmen kromatin dari *wheatgrass* yang terintrogressi ke dalam genom tanaman gandum (**Gambar 26**). Profil DNA dari galur introgresi ini akan mengungkapkan banyak perbedaan genetik dan epigenetik, termasuk adanya delesi sekuens, perubahan regulasi ekspresi gen, perubahan pola metilasi sitosin, dan reaktivasi retrotransposon.

Variasi fenotipik muncul sebagai akibat dari perbedaan segmen *wheatgrass* yang terintrogresi. Hibridisasi somatik asimetris ini dapat mengeksplorasi variasi genetik dan epigenetik yang disebabkan oleh perubahan genom (Liu et al. 2015).

## M. PEMETAAN GENOM

Pemetaan genom dapat dilakukan melalui perakitan hibrida somatik asimetris. Cheng et al. (2006), melakukan fusi protoplas antara tanaman gandum (*Triticum aestivum* L.) cv. “Jinan 177” dan ryegrass Italia (*Lolium multiflorum* Lam.). Ryegrass tanpa atau dengan iradiasi UV digunakan sebagai protoplas donor, dan memberikan sejumlah kecil kromatin, karena sebagian besar kromosom ryegrass telah dieliminasi melalui radiasi, sehingga kalus dan tanaman hibrida somatik menunjukkan morfologi seperti gandum. Beberapa galur hibrida digunakan untuk analisis distribusi dan hereditas DNA



**Gambar 26**

Produksi hibrida somatik asimetris dalam menghasilkan populasi galur-galur intrograsi, yang membawa substitusi segmen DNA tanaman wheatgrass (warna merah) kedalam genom tanaman gandum (warna hitam).

**Sumber:** Liu et al. (2015)



tanaman donor (ryegrass) dalam genom hibrida. Distribusi DNA ryegrass dalam genom gandum dianalisis dengan menggunakan 21 penanda (marka molekular) SSR spesifik genom tanaman ryegrass. Fragmen SSR ryegrass di dalam galur tanaman hibrida somatik asimetris tetap stabil selama periode 2 - 3 tahun, dan dapat digunakan untuk menganalisis introgressi DNA ryegrass ke dalam genom tanaman gandum, dan untuk pemetaan genom.

## **N. PEMBUATAN HIBRIDOMA DALAM MENGHASILKAN ANTIBODI**

Hibridoma adalah fusi sel pada organisme tingkat tinggi yang bertujuan untuk mendapatkan gabungan sifat kedua sel induk, misalnya fusi sel manusia dan tikus untuk menghasilkan antibodi untuk pengobatan kanker. Fusi protoplasma pada sel hewan dan manusia sangat berguna terutama untuk menghasilkan hibridoma.

Hibridoma merupakan hasil fusi yang terjadi antara sel pembentuk antibody dan sel mieloma. Sel pembentuk antibodi ini adalah sel limfosit B, sedangkan sel mieloma sendiri merupakan sel kanker. Sel hibridoma yang dihasilkan dapat membelah secara tidak terbatas seperti sel kanker, tetapi juga menghasilkan antibodi seperti sel-sel limfosit B. Hibridoma yang dihasilkan diseleksi karena setiap sel menghasilkan antibodi yang sifatnya khas. Satu antibodi yang dihasilkan spesifik untuk satu antigen. Setiap hibrid ini kemudian diperbanyak (dikloning). Oleh karena antibodi ini berasal dari satu klon maka antibodi ini disebut antibodi monoklonal.

## **O. SISTEM TRANSFORMASI GENETIK YANG STABIL UNTUK ANALISIS FUNGSIONAL GEN**

Penggunaan protoplas tanaman merupakan cara alternatif untuk sistem transformasi genetik yang stabil dalam analisis fungsional gen pada beberapa kasus, seperti analisis lokalisasi subseluler protein, protein-protein in vivo dan interaksi protein-DNA, transduksi sinyal (Yu et al., 2017). Saat ini, ekspresi transien berbasis studi mesofil protoplas secara rutin digunakan dalam studi biologi di berbagai jenis tanaman.

## **P. REKAYASA GENETIK PADA JAMUR DAN BAKTERI**

Protoplas mengandung semua organel sel intraseluler. Saat ini sebagian besar laboratorium yang terlibat dalam genetika jamur melakukan prosedur manipulasi gen menggunakan protoplas. Fusi protoplas dilakukan untuk lebih meningkatkan sifat genetik dari strain jamur. Melalui fusi protoplas, manipulasi dan rekayasa genetik dari jamur dan bakteri dapat dilakukan. Proses ini melibatkan mutagenesis, transformasi, dan fusi protoplas (Evans 1983). Biokonversi langsung dari bahan selulosa menjadi etanol fusi antara *Trichoderma reesei* dan *Saccharomyces cerevesie* merupakan teknik terbaik dan pendekatan alternatif untuk produksi etanol. Proses ini juga sangat membantu dalam produksi selulase lengkap. Fusi protoplas antara *T.reesei* dan *Aspergillus niger* menghasilkan lebih banyak endo dan exoglucanase.

Fusi protoplas yang diinduksi secara elektrofusi juga digunakan untuk menghasilkan hibrida yang menghasilkan strain ragi yang memproduksi ergosterol. Beberapa produk fusi terbukti menghasilkan kandungan ergosterol dalam jumlah yang stabil selama beberapa generasi (Avram et al 1992). Yari et al (2002) mempelajari efek fusi protoplas pada produksi endotoksin pada *Bacillus thuringiensis spp* dan menemukan bahwa strain hasil fusi *Bacillus thuringiensis* memiliki 1,48 kali lebih banyak  $\delta$ -endotoksin daripada jenis liar.

Fusi antara *Penicillium chrysogenum* dan *Cephalosporium acremonium* menghasilkan antibiotik laktam yang sudah dipatenkan di Amerika dengan nomor US Patent 7241588. Das dan Ghosh (1989) melakukan fusi protoplas antara dua galur *Aspergillus niger* 8-2 (galur yang tumbuh cepat dan produsen *glukoamilase* yang buruk) dengan *Aspergillus niger* 8-7 (galur yang lambat dan penghasil enzim *glukoamilase* yang baik). Hasil fusi antara kedua galus tersebut dapat menghasilkan 68% *glukoamilase* lebih banyak dari pada kedua tetuanya.

# KERAGAMAN GENETIK TANAMAN HASIL FUSI PROTOPLAS

Dalam fusi protoplas, penggabungan tidak hanya terjadi antara genom inti dari kedua tanaman, tetapi juga dari sitoplasma kedua tanaman, sehingga keragaman genetik cenderung sangat tinggi dan terkadang sulit diprediksi. Keragaman tanaman yang dihasilkan melalui fusi protoplas umumnya lebih tinggi dibandingkan melalui persilangan seksual. Hal ini dikarenakan terjadinya segregasi inti dan sitoplasma yang menghasilkan kombinasi unik antara informasi genetik pada inti dan sitoplasma. Beberapa hal berikut merupakan keragaman genetik tanaman yang dapat ditimbulkan akibat hibridisasi somatik.

## A. VARIASI KARAKTER MORFOLOGI

Tanaman hasil fusi dapat berupa tanaman dengan sifat-sifat gabungan dari kedua tetuanya, sebagai contoh gabungan antara karakter morfologi dari kedua tetua tanaman terong dan kentang diamati pada turunan hasil fusi dari kedua tanaman tersebut (Yu et al. 2013). Gabungan sifat antara kedua tetua fusi dapat diwariskan

pada turunan hasil fusi, baik sifat yang diinginkan maupun sifat-sifat yang tidak diharapkan terutama jika salah satu tetua fusi berasal dari spesies liar. Oleh karena itu, untuk menghilangkan sifat-sifat yang tidak diinginkan tersebut maka perlu dilakukan silang balik (*back cross*) dengan salah satu tetua fusi.

## **B. HILANGNYA BEBERAPA INFORMASI GENETIK.**

Adanya instabilitas kombinasi inti sel dapat menyebabkan hilangnya beberapa informasi genetik. Beberapa permasalahan yang timbul dalam pemanfaatan fusi protoplas dalam program pemuliaan adalah adanya ketidakstabilan genetik. Oleh karena itu perlu analisis lanjut turunan hasil fusi untuk melihat kestabilan genetik dari tanaman dan keturunan berikutnya.

## **C. PENGGABUNGAN SITOPLASMA TANAMAN**

Adanya penggabungan antara sitoplasma antara kedua tetua fusi mengakibatkan terjadinya rekombinasi antara mitokondria dan kloroplas, yang umumnya tidak terjadi pada persilangan seksual (dalam persilangan seksual, umumnya mitokodria dan kloroplas dibawa oleh sel gamet betina). Hal ini dapat meningkatkan keragaman produk fusi karena membawa kedua karakter yang pewarisannya dipengaruhi oleh DNA mitokondria dan DNA kloroplas. Pemulihan sterilitas yang dibawa oleh sitoplasma (*cytoplasmic male sterility*) juga mungkin terjadi akibat penggabungan sitoplasma kedua tetua fusi.

## **D. TERJADINYA VARIASI SOMAKLONAL**

Variasi somaklonal dapat diinduksi oleh kondisi kultur *in vitro* dan menghasilkan variasi genetik baru. Variabilitas yang dihasilkan akibat subkultur dalam fusi protoplas relatif tinggi sehingga dapat membentuk keragaman somaklonal. Namun sebaliknya, variasi somaklonal juga dapat menghasilkan somaklon-somaklon dengan sifat agronomis yang lebih baik.

## **E. INDUKSI STERILITAS TANAMAN**

Hilangnya kesuburan dapat terjadi pada tanaman hibrida somatik. Fusi protoplas bahkan dapat menghasilkan tanaman yang benar-benar steril, tanaman superior yang tidak dapat menghasilkan bunga, dan tidak mampu menghasilkan gamet. Hilangnya kesuburan tanaman juga diduga berkaitan dengan terjadinya ketidakseimbangan jumlah kromosom, seperti kondisi aneuploidi pada tanaman (Gavrilenko et al. 1999). Hal ini dapat menginduksi penurunan viabilitas polen atau kemampuan tanaman membentuk organ generatif yang lengkap dan sempurna.

## **F. INDUKSI POLIPLOIDISASI**

Dalam fusi protoplas, populasi tanaman hibrida somatik tetraploid heterozigot dapat diperoleh dalam satu tahapan karena tidak adanya segregasi pada proses meiosis. Fusi protoplas saat ini telah digunakan secara luas pada tanaman kentang untuk mensintesis ulang tanaman tetraploid melalui fusi intraspesifik dari tanaman diploid.

Tingkat ploidi yang jauh lebih tinggi seperti hexaploid atau oktaploid juga mungkin didapatkan melalui fusi protoplas. Hal ini dapat terjadi karena gabungan dari beberapa protoplasma atau kegagalan segregasi pada waktu pembelahan sel setelah terjadi fusi. Pada penelitian yang dilakukan Gavrilenko et al. (1999), fusi protoplas antara tanaman diploid *Solanum tuberosum* ( $2n=2x=24$ ) dan *S. phureja* ( $2n=2x=24$ ), menghasilkan tanaman dengan berbagai jumlah ploidi tidak hanya tetraploid ( $4x$ ), tetapi juga hexaploid ( $6x$ ) dan oktaploid ( $8x$ ).

Perbedaan tingkat ploidi tersebut ditenggarai juga akan mempengaruhi fenotipik dari tanaman. Hibrida somatik tetraploid dan heksaploid diamati lebih vigor, dengan daun yang lebih luas dan jumlah helai daun yang lebih rendah dibandingkan kedua tetua diploidnya. Sedangkan tanaman yang oktaploid memiliki morfologi yang lebih lemah, pertumbuhan yang lebih terhambat, bentuk leaflet tunggal yang bundar dan hasil umbi yang lebih rendah dari pada tetua diploid. Beberapa tanaman bahkan tidak mampu menghasilkan umbi. Tanaman tetraploid juga diamati lebih tinggi dan memiliki lebih banyak daun lateral dan daun sekunder, dengan daun terminal dan daun lateral yang lebih sempit daripada tanaman hexaploid atau oktaploid (Gavrielenko, 1999).

## G. TERJADINYA ANEUPLOIDI

Karakterisasi dari hasil hibrida somatik pada tanaman kentang menunjukkan adanya perubahan sitogenetik seperti aneuploidi dan penataan ulang kromosom, yang dapat menyebabkan variasi yang luas dalam karakter morfologi, hilangnya sifat agronomis penting dan menghasilkan variasi yang tidak diinginkan. Menurut Gavrilenko et al. (1999), fusi protoplas yang menghasilkan tanaman dengan ploidi yang tinggi seiring dengan meningkatnya persentase terjadinya aneuploidi pada produk hasil fusi.

Dampak negatif dari hibridisasi somaklonal, yaitu terbawanya karakter-karakter yang tidak diinginkan dalam fusi protoplas, yang dapat diminimalkan dengan melakukan silang balik (*backcross*) berulang kali kepada salah satu tetua komersial.





# FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KEBERHASILAN FUSI PROTOPLAS

Keberhasilan fusi protoplas dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah jenis tanaman, genotip tanaman, jaringan sumber dari protoplas, komposisi dan konsentrasi enzim yang digunakan saat isolasi protoplas, konsentrasi PEG dan DMSO yang digunakan pada induksi fusi yang menggunakan PEG, keberadaan senyawa  $\text{CaCl}_2$  sebagai larutan pencuci dan induksi fusi, derajat keasaman (pH) baik pada larutan enzim maupun media induksi fusi dan regenerasi protoplas, suhu inkubasi, metoda fusi yang digunakan, ada atau tidaknya radiasi ultraviolet, regenerasi protoplas, serta kepadatan *plating* dalam regenerasi protoplas.

## A. JENIS TANAMAN

Jenis tanaman mempengaruhi keberhasilan fusi protoplas, baik antara tanaman monokotil dan dikotil, atau antara tanaman berkayu atau tidak berkayu. Keberhasilan hibridisasi somatik pada tanaman monokotil lebih rendah dibandingkan tanaman dikotil (Mishra et

al. 2015). Sedangkan pada tanaman berkayu, umumnya regenerasi protoplas menjadi tanaman merupakan hambatan utama yang membatasi pemanfaatan teknik ini. Tetapi pada spesies tertentu dilaporkan keberhasilan regenerasi protoplas menjadi tanaman, misalnya pada tanaman *Eucalyptus*, *Populus alba*, *P. sieboldii*, *Picea abies*, *P. glauca*, *Pinus taeda* dan *Larix × eurolepis* (Puite 1992).

Pada tanaman konifer, protoplas yang diisolasi dari embrio somatik, jaringan embriogenik atau suspensi dari sel embriogenik lebih mudah untuk diregenerasikan menjadi tanaman. Sedangkan protoplas yang diisolasi dari jaringan lainnya masih menjadi menemui hambatan.

## B. GENOTIP

Keberhasilan fusi protoplas dipengaruhi oleh genotipe dari tanaman yang digunakan, baik genotipe tanaman yang berada dalam spesies yang sama atau dalam genus yang sama. Adanya perbedaan dari jumlah protoplas berkualitas yang dihasilkan dari dua spesies *Canna* yang berbeda tetapi masih dalam satu genus yang sama, yaitu *Canna indica* and *Canna edulis* diamati dalam studi yang dilakukan oleh Mishra et al. (2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Geerts et al. (2008) yang melakukan fusi protoplas antara genotipe-genotipe dari beberapa spesies kacang-kacangan dari genus *Phaseolus*, yang terdiri atas *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L. dan *Phaseolus polyanthus* Greenm., menunjukkan pengaruh genotipe terhadap keberhasilan isolasi dan fusi dari protoplas. Terdapat perbedaan jumlah dan viabilitas protoplas yang dihasilkan, tidak hanya antara spesies *Phaseolus* yang berbeda, tetapi juga antara genotipe yang berbeda dari spesies yang sama (**Tabel 4**).

Jumlah fusi protoplas heterokaryon yang dihasilkan juga berbeda antar genotipe, baik dalam induksi fusi secara kimia dengan menggunakan PEG, maupun elektrofusi. Persentase fusi heterokaryon yang didapatkan bervariasi antara 5,5-17,8% untuk fusi kimia, dan berkisar antara 1,0-6,7% untuk elektrofusi (**Tabel 5**). Oleh karena itu diperlukan optimasi metode isolasi dan media regenerasi protoplasma pada genotip tanaman yang berbeda.

**Tabel 4.** Pengaruh dari genotipe terhadap jumlah dan viabilitas protoplas yang dihasilkan

| Genotipe    | Enzim yang#<br>digunakan | Jumlah Protoplas<br>( $10^3 \text{ ml}^{-1}$ ) | Viabilitas*<br>Protoplas |
|-------------|--------------------------|--|--------------------------|
| NI0016 (PC) | 3402-YC                  | 377  | 88,0 ± 4,1               |
| NI0016 (PC) | 3402-RS                  | 412  | 90,8 ± 4,3               |
| NI0229 (PC) | 3402-YC                  | 886  | 91,8 ± 4,2               |
| NI0229 (PC) | 3402-RS                  | 760  | 89,0 ± 5,8               |
| NI1015 (PP) | 3402-RS                  | 258  | 92,4 ± 5,2               |
| NI638 (PV)  | 3402-RS                  | 516  | 90,6 ± 5,8               |
| NI637 (PV)  | 3402-RS                  | 188  | 91,9 ± 4,7               |

**Keterangan:**

(PC)=*Phaseolus coccineus* L.

(PP)= *Phaseolus polyanthus* Greenm.;

(PV)= *Phaseolus vulgaris* L.

\*Data disajikan dalam bentuk nilai tengah ± standar deviasi.

#Campuran enzim 3402 adalah: 3% Macerozyme R10, 4% Cellulase Onozuka, 0,2% Pectolyase Y-23. RS dan YC adalah tipe dari enzim Cellulase Onozuka yang digunakan.

**Sumber:** Geerts et al. (2008)

**Tabel 5.** Pengaruh dari genotip dan teknik fusi terhadap persentase fusi heterokaryon yang dihasilkan

| PV    | Aksesi    |        | Fusi Kimia | Elektrofusi           |                       |
|-------|-----------|--------|------------|-----------------------|-----------------------|
|       | PC        | PP     | PEG 6000   | 750 V.cm <sup>3</sup> | 1500V.cm <sup>3</sup> |
| NI638 | NI0016-RS |        | 5,5        |                       |                       |
| NI638 | NI0016-YC |        | 17,8       |                       |                       |
| NI638 | NI0229-RS |        | 8,3        |                       |                       |
| NI638 | NI0229-YC |        | 15,3       |                       |                       |
| NI638 |           | NI1015 | 9,5        |                       |                       |
| NI637 | NI0016-RS |        |            | 6,7                   | 4,3                   |
| NI637 | NI0016-YC |        |            | 6,7                   | 3,5                   |
| NI637 | NI0229-RS |        |            | 1,5                   | 5,8                   |
| NI637 | NI0229-YC |        |            | 1,0                   | 1,0                   |
| NI637 |           | NI1015 |            | 3,8                   | 2,0                   |

**Sumber:** Geerts et al. (2008)

## C. KEKERABATAN/JARAK GENETIK

Fusi yang terjadi antara dua tetua yang jarak genetiknya dekat akan mempunyai peluang keberhasilan lebih tinggi dibandingkan dengan protoplas yang berasal dari tanaman yang jarak genetiknya jauh. Adanya eliminasi kromosom secara spontan dapat terjadi pada hibridisasi somatik antar tetua yang jarak genetiknya jauh.

## D. INKOMPATIBILITAS TANAMAN

Faktor inkompatibilitas tanaman sangat mempengaruhi keberhasilan fusi protoplas. Biasanya, faktor inkompatibilitas ini juga dipengaruhi oleh jarak genetik dari tanaman tersebut. Adanya inkompatibilitas inti-sitoplasma yang dapat terjadi pada fusi antar genus atau inter-genera

juga merupakan faktor penghambat dari keberhasilan fusi. Misalnya pada famili solanaceae, hasil fusi cybrid antara *Atropa belladonna* dengan *Nicotiana tabacum* akan mengalami defisiensi klorofil karena adanya inkompatibilitas antara genom inti *A. belladonna* dengan kloroplas dari *N. tabacum* (Puite 1992).

## E. JARINGAN SUMBER PROTOPLAS

Jaringan yang digunakan sebagai sumber protoplas sebaiknya diambil dari bagian yang sangat muda (meristematis) dapat berupa daun muda atau hipokotil. Protoplas yang berasal dari sel muda mempunyai vakuola yang lebih kecil daripada vakuola sel dewasa. Besar kecilnya vakuola sel yang dihasilkan akan berpengaruh terhadap terjadinya fusi protoplas. Protoplas yang mengandung vakuola yang besar akan lebih sulit berfusi dibandingkan dengan protoplas yang memiliki vakuola yang kecil, sehingga jumlah protoplas hasil fusi yang dihasilkan dari kedua jenis sel juga berbeda.

Pada tanaman pisang dan monokotil lainnya seperti padi, jagung dan gandum, hasil dan viabilitas protoplas yang lebih rendah diamati jika protoplas berasal dari jaringan mesofil. Protoplas yang kurang layak dari jaringan mesofil dapat dihubungkan dengan sensitivitas daun terhadap tekanan enzimatik, yang dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan sel selama proses degradasi dinding sel secara enzimatik (Mishra et al. 2015).

Jaringan sebaiknya diambil dari tanaman yang ditumbuhkan di rumah kaca. Tanaman yang ditanam di luar rumah kaca dapat juga digunakan tetapi keberhasilannya tidak lebih dari 25 persen. Hal ini terkait dengan peluang kontaminasi yang mungkin ditimbulkan.

## F. KOMPOSISI DAN KONSENTRASI ENZIM

Komposisi dan konsentrasi enzim yang digunakan untuk isolasi protoplas tergantung pada spesies tanaman dan sumber jaringan yang digunakan untuk menghasilkan protoplas. Larutan enzim yang digunakan harus mengandung osmoliticum stabilizer, misalnya macerozym, selulose, sehingga protoplas tidak rusak. Menurut Nea and Bates (1987), enzim yang digunakan untuk isolasi protoplas juga ditemukan memiliki pengaruh yang besar terhadap efisiensi fusi pada elektrofusi tanaman wortel (*Daucus carota*). Campuran enzim Cellulysin dan Driselase menyebabkan peningkatan fusi dua kali lipat dibandingkan dengan penggunaan enzim Driselase saja. Stimulasi oleh Cellulysin menyebabkan adanya modifikasi enzimatik dari permukaan sel. Perlakuan sel dengan pronase atau proteinase K (secara singkat) juga dapat menggandakan efisiensi fusi. Modifikasi protein membran / permukaan sel selama isolasi protoplas sangat penting dalam menentukan efisiensi elektrofusi.

## G. KONSENTRASI PEG DAN DMSO YANG DIGUNAKAN

Pada perlakuan fusi dengan menggunakan PEG, konsentrasi PEG yang digunakan akan menentukan besar kecilnya persentase fusi yang terjadi. Hasil penelitian fusi protoplas antara tanaman jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour.) dengan jeruk Mandarin Satsuma (*C. unshiu* Marc.) menunjukkan bahwa rata-rata jumlah fusi protoplas yang dihasilkan dari induksi fusi dengan PEG 30% lebih banyak

dari pada induksi fusi dengan PEG 4% (Husni, 2010). Selain pada tanaman jeruk, pada tanaman hias seperti petunia, peningkatan konsentrasi PEG diiringi dengan peningkatan frekuensi agregasi protoplas total, tetapi agregasi tertinggi antara protoplas terjadi pada larutan PEG 30% (Seon et al., 1985).

Konsentrasi dan jenis PEG yang digunakan juga mempengaruhi keberhasilan fusi protoplas pada spesies fungi/ jamur (Ferenczy, 1976). Fusi protoplas dari jamur *Streptomyces coelicolor* dilakukan dengan memasukkan pelet protoplas ke dalam 1 ml larutan fusan yang terdiri atas 40% (b/v) PEG (BM 1000), 14% (v/v) dimetil sulfida (DMSO) selama 1 menit. Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan frekuensi rekombinasi dari protoplas (fusi protoplas) apabila konsentrasi PEG yang diberikan dinaikkan sekitar 50% (tanpa pemberian DMSO). Akan tetapi, terjadi penurunan frekuensi rekombinasi protoplas apabila konsentrasi PEG ditingkatkan menjadi 60 dan 70% (Hopwood & Wright, 1979).

## H. PENGGUNAAN $\text{CaCl}_2$ SEBAGAI LARUTAN PENCUCI/INDUKSI FUSI

Penambahan larutan pencuci (0.5 M manitol+0.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) setelah induksi fusi dapat meningkatkan frekuensi terjadinya fusi (Husni, 2010). Adanya peningkatan frekuensi fusi tersebut disebabkan oleh adanya  $\text{CaCl}_2$  dalam larutan pencuci yang digunakan. Frekuensi fusi protoplas dapat meningkat apabila pada suspensi protoplas yang difusikan dengan PEG di cuci dengan larutan pencuci atau hipotonik. Keberadaan ion  $\text{Ca}^{2+}$  dalam larutan hipotonik dapat meningkatkan frekuensi fusi antar protoplas (Veilleux et al. 2005).



Pengaruh kehadiran dari  $\text{CaCl}_2$  juga diamati pada penelitian Keller dan Melchers (1973), pada fusi protoplas daun tanaman tembakau. Pada penelitian tersebut, diamati bahwa konsentrasi kalsium yang digunakan sangat mempengaruhi keberhasilan dalam fusi protoplas. Jika kadar kalsium kurang dari 0,03 M, sangat sedikit fusi protoplas yang terjadi. Peningkatan frekuensi fusi terjadi pada konsentrasi 0,05 M  $\text{CaCl}_2$ , dimana terdapat lebih dari 25% protoplas yang berfusi. Peningkatan konsentrasi  $\text{CaCl}_2$  menjadi 0,1 dan 0,2 M menghasilkan frekuensi fusi yang lebih rendah dibandingkan pada konsentrasi 0,05 M  $\text{CaCl}_2$ . Jika konsentrasi kalsium terlalu rendah, protoplas menjadi longgar sehingga peluang fusi menjadi rendah.

## I. KADAR KEASAMAN (PH)

Peranan pH dalam hal ini adalah menentukan aktifitas enzim yang digunakan dalam proses isolasi protoplas. pH larutan enzim yang umum digunakan pada isolasi protoplas adalah 4,6-6.

Peranan pH dalam keberhasilan fusi protoplas tidak hanya untuk mengoptimalkan kerja enzim pada proses isolasi protoplas saja, tetapi juga pada media fusi protoplas yang digunakan. Menurut Keller dan Melchers (1973), pH optimal untuk larutan induksi fusi berkisar antara 9,5-10,5. Penggunaan pH larutan fusi yang lebih rendah, yaitu 8,5 —9,0, menghasilkan frekuensi fusi yang lebih rendah. Kondisi pH yang tinggi dapat menginduksi pembentukan intramembran. Tetapi, jika pH larutan lebih tinggi dari 11,0 cenderung menyebabkan protoplas mengalami kerusakan setelah 30 menit.

Selain itu, optimalisasi pH juga perlu dijaga pada media regenerasi protoplas, agar protoplas berada pada kondisi yang sesuai untuk mendukung perkembangannya.

## **J. TEMPERATUR/SUHU INKUBASI**

Suhu inkubasi merupakan faktor penting yang menentukan kecepatan dan frekuensi fusi protoplas. Fusi protoplas tidak terjadi jika protoplas diinkubasi pada suhu 0 °C. Pada suhu 23 °C, protoplas berkumpul perlahan dan mengalami fusi setelah dua jam kemudian. Peningkatan suhu inkubasi menjadi 45 °C dapat mempercepat proses fusi, dimana protoplas menjalani fusi dalam waktu 30 menit, tetapi selanjutnya keadaan protoplas memburuk dan pecah setelah 30 menit inkubasi. Temperatur 37 °C dianggap sebagai suhu optimal untuk induksi fusi dan menghasilkan frekuensi fusi protoplas yang tinggi dengan efek negatif yang minimal terhadap viabilitas protoplas (Keller dan Melchers, 1973).

## **K. METODA FUSI PROTOPLAS**

Metoda fusi protoplas yang digunakan mempengaruhi keberhasilan dari protoplas. Metoda induksi fusi tentu akan menghasilkan persentase fusi yang lebih tinggi dibandingkan dengan fusi spontan, akan tetapi metoda induksi fusi yang berbeda juga akan menghasilkan tingkat keberhasilan fusi yang berbeda. Diantara ketiga metoda induksi fusi, fusi mekanik menghasilkan persentase keberhasilan fusi protoplas yang lebih rendah dibandingkan kemofusi dan elektrofusi.

Efektifitas kemofusi dan elektrofusi juga berbeda tergantung dari berbagai faktor, diantaranya genotipe tanaman atau organisme yang akan difusikan, serta konsentrasi PEG (untuk kemofusi) dan voltase listrik (untuk elektrofusi) yang digunakan, seperti pada penelitian Geerts et al. (2008) yang disajikan pada Tabel 5. Oleh karena itu optimasi setiap teknik fusi yang digunakan sangat diperlukan untuk mendapatkan persentase keberhasilan fusi yang tinggi.

## L. RADIASI ULTRAVIOLET

Pada percobaan fusi protoplas spesies jamur *Streptomyces coelicolor*, terjadi peningkatan frekuensi fusi setelah proses iradiasi dengan menggunakan sinar ultraviolet. Perlakuan iradiasi dengan sinar ultraviolet selama 2 atau 4 menit dapat meningkatkan frekuensi rekombinan fusi yang dihasilkan (**Tabel 6**).

## M. REGENERASI PROTOPLAS

Hambatan utama dalam aplikasi teknik fusi protoplas dalam pemuliaan tanaman adalah sulitnya regenerasi dari protoplas menjadi tanaman. Kesulitan dalam meregenerasikan protoplas hasil fusi menjadi tanaman tergantung dari jaringan dan spesies tanaman yang digunakan sebagai sumber dari protoplas. Dalam regenerasi protoplas, media dan teknik regenerasi sangat berpengaruh terhadap kemampuan sel fusan untuk berploriferasi dan beregenerasi menjadi tanaman yang utuh.

**Tabel 6.** Pengaruh dari iradiasi ultraviolet suspensi protoplas jamur *Streptomyces coelicolor* terhadap frekuensi rekombinan protoplas yang dihasilkan

| Tetua       | Dosis UV | Jumlah koloni | Rekombinan | Persentase Rekombinan |
|-------------|----------|---------------|------------|-----------------------|
| M124 x M130 | 0        | 3558          | 400        | 11,2                  |
| 2692 x E104 | 0        | 375           | 6          | 1,5                   |
|             | 4        | 389           | 49         | 12,9                  |
| M124 x M130 | 0        | 277           | 35         | 12,6                  |
|             | 4        | 369           | 95         | 25,7                  |
| 2692 x E104 | 0        | 282           | 56         | 19,9                  |
|             | 2        | 286           | 73         | 25,5                  |
|             | 4        | 189           | 72         | 38,1                  |

**Sumber:** Hopwood & Wright (1979)

## **N. KEPADATAN *PLATING* DALAM REGENERASI PROTOPLAS**

Pada fusi protoplas beberapa jenis jamur (fungi), seperti pada *Streptomyces acrimycini* (Hopwood et al., 1977), frekuensi rekombinasi setelah fusi protoplas rendah ketika protoplas hasil fusi di regenerasikan pada petridish dengan kerapatan yang padat. Hal ini mungkin dikarenakan koloni-koloni lain yang berkembang dari fragmen-fragmen miselium yang bukan merupakan hasil fusi protoplas (protoplas dari kedua genotipe tetua yang bukan rekombinan) yang terdapat dalam suspensi protoplas menghambat perkembangan/regenerasi koloni protoplas rekombinan (hibrida), yang berkembang lebih lambat dibandingkan protoplas yang bukan hasil fusi.



# PROTOKOL FUSI PROTOPLAS PADA TANAMAN KENTANG DAN GENUS SOLANUM

Menurut Fish (1988), protoplas tanaman kentang pertama kali berhasil diisolasi dari bagian umbi kentang oleh Lorenzini pada tahun 1973. Sedangkan keberhasilan protoplas kentang (yang berasal dari sel mesofil) membelah pertama kali dilaporkan oleh Upadhyya pada tahun 1975, walaupun sel tersebut belum mampu beregenerasi membentuk tunas, hanya membentuk kumpulan sel/kalus.

Shepard dan Totten (1977) mempublikasikan protokol pertama mengenai isolasi dan kultur protoplas yang mampu meregenerasikan tunas dari sel mesofil tanaman kentang dari varietas kentang komersial Russet Burbank. Selanjutnya protokol dasar yang dipublikasikan oleh Shepard dkk. tersebut berhasil dikembangkan lebih lanjut dan efisiensi regenerasi protoplas dapat ditingkatkan melalui modifikasi berbagai komponen media kultur, media regenerasi protoplas dll.

Prosedur isolasi protoplas yang berkembang saat ini bervariasi, tergantung dari sumber protoplas atau sumber eksplan yang digunakan. Dalam buku ini, disajikan metode fusi protoplas yang

dikembangkan oleh Fish (1988) dan beberapa prosedur umum yang dipublikasikan oleh peneliti lainnya yang sering digunakan dalam perbanyakan tanaman donor, teknik isolasi, fusi dan kultur protoplas tanaman kentang, serta tanaman dari genus solanum lainnya.

## A. TANAMAN DONOR

Tanaman induk sebagai sumber protoplas (tanaman donor) adalah tanaman kentang yang telah ditumbuhkan secara invitro. Sumber protoplas dari tanaman yang ditumbuhkan secara invitro merupakan sumber protoplas yang paling baik, karena dapat mengurangi peluang terjadinya kontaminasi. Tanaman induk dikulturkan dengan menggunakan media MS (Murashige and Skoog, 1962) (**Tabel 7**) tanpa penambahan hormon/zat pengatur tumbuh tanaman dan diinkubasi dalam ruang kultur dengan penyinaran 16 jam per hari, pada suhu  $\pm 25$  °C. Perbanyakan tanaman induk dapat dilakukan dengan menggunakan eksplan stek batang yang membawa satu nodus. Untuk keperluan isolasi protoplasma, diperlukan sekitar 10-20 plantlet dari masing masing genotipe tetua fusi, yang berumur 4-6 minggu.

Jika tanaman donor bukan berasal dari tanaman yang ditumbuhkan secara invitro, maka organ tanaman yang digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu. Biasanya dapat menggunakan tunas/pucuk yang ditumbuhkan dari biji atau dari umbi kentang. Sterilisasi eksplan dapat dilakukan dengan merendam eksplan dalam 150 ml larutan pemutih/klorox pada konsentrasi 5-10% selama 5-10 menit, tidak perlu dishaker/digoyang. Buang larutan klorox perlahan lahan, dan cuci eksplan sebanyak 6 kali dengan menggunakan air destilata steril.

## B. ISOLASI PROTOPLAS

Proses isolasi protoplas dilakukan secara steril di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) serta dengan menggunakan peralatan yang telah disterilkan. Bagian tanaman yang digunakan sebagai sumber sel mesofil adalah daun. Penggunaan daun sebagai sumber eksplan dianggap paling baik dalam isolasi protoplasma sel mesofil tanaman kentang dibandingkan dengan penggunaan pucuk tanaman. Hal ini dikarenakan eksplan pucuk memiliki beberapa kelemahan sebagai sumber protoplas, diantaranya adalah:

- Banyak debris/kotoran sel yang mengkontaminasi dalam proses isolasi dan fusi protoplasma,
- Jumlah protoplas utuh yang dihasilkan sedikit, bahkan pada beberapa kasus, hampir tidak ada protoplas utuh yang didapatkan,
- Jumlahnya eksplan terbatas, sehingga mengalami kendala untuk menyediakan sumber eksplan yang cukup.

Isolasi protoplasma dari sel mesofil daun dilakukan dengan menggunakan daun yang sudah terbuka penuh. Pisahkan daun dari plantlet dengan menggunakan gunting steril sebanyak 0,5-1 g (dari 10 plantlet). Kemudian daun diletakkan dalam 50 mL *conditioning media* (**Tabel 7**) dengan penambahan NAA 20 mgL<sup>-1</sup> dan BAP 10 mgL<sup>-1</sup> dan diinkubasi gelap selama 16-18 jam (*overnight*) pada suhu 4 °C.



**Tabel 7.** Komposisi media MS (Murashige and Skoog, 1962) dan *conditioning media* media pendingin (Fish, 1988)

| Komponen   | MS Media (mg.L <sup>-1</sup> ) | Conditioning Media (mg.L <sup>-1</sup> ) |
|--|--------------------------------|--|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 1650                           | -  |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1900                           | 190                                      |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                 | 440                            | 44                                       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 170                            | 17                                       |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 370                            | 37                                       |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 6,2                            | 0,6                                      |
| KI   | 0,83                           | 0,08                                     |
| Na <sub>2</sub> .MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                           | 0,03                                     |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                 | 0,025                          | 0,003                                    |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                  | 22,3                           | 2  |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 8,6                            | 0,9                                      |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                 | 0,025                          | 0,003                                    |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 27,8                           | 2,8                                      |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 37,3                           | 3,7                                      |
| Thiamine HCl   | 0,1                            | 0,005                                    |
| Pyridoxine HCl                                       | 0,1                            | 0,005                                    |
| Nicotinic acid                                       | 0,5                            | 0,5                                      |
| Glycin   | 2                              | 0,2                                      |
| Folic acid   | -                              | 0,05                                     |
| Biotin   | -                              | 0,005                                    |
| Myo-inositol   | 100                            | 10                                       |
| Sukrosa (gula)                                       | 20.000                         | -  |
| pH   | 5,6                            | 5,6                                      |

Selanjutnya, daun dipotong/diiris menjadi potongan kecil (0,5-1 mm) dengan pisau bedah/*scalpel* yang tajam. Irisan daun ditempatkan dalam 50 mL larutan preplasmolisis (**Tabel 8**) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Beberapa peneliti langsung melakukan tahapan ini tanpa menginkubasi daun yang digunakan dalam larutan *conditioning media* terlebih dahulu (Thieme et al. 1997; Purwito 1999; Chen et al. 2008).

Setelah proses preplasmolisis, sebanyak 0,5 g irisan daun dimasukkan ke dalam 20 mL larutan enzim (**Tabel 9**) di dalam petridish yang memiliki diameter 9 cm dan ditutup dengan aluminium foil. Larutan enzim yang digunakan terdiri atas garam-garam mayor, mannitol, serta beberapa enzim yang berperan dalam proses digesti dinding sel, yaitu *Meicelase P* dan *Pectolyase Y23*. Meicelase P adalah enzim selulase, sedangkan *Pectolyase Y23* adalah enzim pektiolase, kedua enzim ini berperan untuk mendegradasi selulosa dan pektin yang merupakan komponen utama penyusun dinding sel. Proses digesti secara enzimatik dilakukan pada suhu 26 °C dan dishaker/digoyang pada 20 rpm selama 3-4 jam. Penggoyangan dilakukan untuk melepaskan protoplas.

Larutan enzim yang digunakan untuk mendegradasi dinding sel dapat juga terdiri atas maserozim (macerozyme R-10) (0,15%) “Yakult, Tokyo, Japan”, selulase (cellulase R-10) (0,7%) “Yakult, Tokyo, Japan”, dan mannitol (7,5 %), selain larutan garam-garam mayor (Ehsanpour dan Jones, 2001). Selulase adalah enzim yang berperan untuk melepaskan protoplasma dari dinding sel, sedangkan maserozim berperan untuk memisahkan sel dari jaringan, sehingga selulase dapat bekerja lebih efektif untuk mendegradasi dinding sel. Beberapa variasi konsentrasi dan jenis enzim juga digunakan pada beberapa metode isolasi protoplas tanaman kentang. Thieme et al.

(1997) menggunakan 0,1 % macerozym dan 0,8 % selulase. Mollers et al. (1992) menggunakan 0,05 % macerozym dan 1,5 % selulase. Sedangkan Cooper-Bland et al. (1996) menggunakan 0,1% driselase, 0,1 % pektiolas Y-23 dan 1,5% selulase. Purwito (1999) menyatakan kombinasi enzim 0,5% selulase RS dan 0,05 % pektiolas Y-23 efektif dalam menghasilkan protoplas dengan hasil dan viabilitas yang baik.

Kombinasi, jenis dan konsentrasi enzim yang digunakan sangat bergantung pada genotype yang digunakan. Kombinasi, jenis dan konsentrasi enzim yang sama dapat menghasilkan jumlah dan viabilitas protoplas yang berbeda pada spesies kentang yang berbeda dalam genus yang sama (Chen et al. 2008), bahkan pada kultivar yang berbeda pada spesies yang sama (Purwito 1999).

Selain jenis dan konsentrasi enzim, lamanya waktu inkubasi untuk proses digesti juga bervariasi. Pada penelitian Chen et al (2008), inkubasi untuk proses digesti dinding sel pada larutan enzim dilakukan selama 16 jam dalam kondisi gelap. Sedangkan pada percobaan yang dilakukan Ehsanpour dan Jones (2001), inkubasi dilakukan pada suhu ruang 25-28 °C dan dishaker pada 40 rpm selama 4-5 jam.

Setelah proses digesti, dilakukan pencucian dan pemurnian protoplas. Proses ini diawali dengan memisahkan protoplas dari debris atau kotoran sel dengan cara menyaring suspensi protoplas menggunakan saringan 50 µm dan kemudian saringan 38 µm. Suspensi yang sudah disaring secara hati-hati dimasukkan ke dalam tabung sentrifus kaca dengan cara dipipet, kemudian disentrifugasi pada 50 g selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pellet/endapan protoplas disuspensikan dalam 2,5 ml larutan pencuci protoplas (**Tabel 9**). Endapan protoplas yang sudah diresuspensi kemudian dengan hati-hati diletakkan di atas larutan Percoll 30% (3 ml Percoll: 7 ml larutan dilusi Percoll (**Tabel 8**)) dan disentrifugasi pada 50 g selama 5 menit. Selanjutnya, suspensi

protoplas diencerkan dengan 10 ml larutan pencuci protoplas segar (dibuat sesaat sebelum digunakan). Suspensi protoplas disentrifugasi kembali pada 50 g selama 5 menit, supernatan dibuang, dan endapan protoplas diresuspensi dalam 5 ml larutan pencuci (**Tabel 9**).

**Tabel 8.** Komposisi media preplasmolisis dan larutan dilusi percoll (Fish, 1988)

| Komponen                             | Larutan Preplasmolisis<br>mg.L <sup>-1</sup> | Larutan Dilusi Percoll<br>mg.L <sup>-1</sup> |
|--------------------------------------|--|--|
| KNO <sub>3</sub>                     | 190  | 190  |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 44   | 44   |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 37   | 37   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 17   | 17   |
| Mannitol                             | 82.000                                       | -  |
| pH                                   | 5,6  | 5,6  |

**Catatan:** Larutan disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

**Tabel 9.** Komposisi larutan enzim dan larutan pencuci protoplas (Fish, 1988)

| Komponen                             | Larutan Enzim*<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | Larutan pencuci**<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------------|---|--|
| KNO <sub>3</sub>                     | 190                                     | 3.800                                      |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O | 924                                     | 1.760                                      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 17                                      | 340  |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | 0,62                                    | 1,55                                       |
| KI                                   | 0,083                                   | 0,21                                       |
| N a <sub>2</sub> .                   |   | 0,063                                      |
| MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O  | 0,025                                   |  |

| Komponen                             | Larutan Enzim*<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | Larutan pencuci**<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------------|---|--|
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 0,0025                                  | 0,0063                                     |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 37                                      | 741  |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O  | 2,23                                    | 5,58                                       |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,86                                    | 2,15                                       |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O | 0,0025                                  | 0,0063                                     |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 2,786                                   | 6,97                                       |
| Na <sub>2</sub> EDTA                 | 3,726                                   | 9,32                                       |
| Mannitol                             | 81.000                                  | 81.000                                     |
| Meicelase P                          | 15.000                                  | -  |
| Pectolyase                           |   | -  |
| Y23                                  | 1.000                                   |  |
| Osmolarity<br>(Mos)                  | 550                                     | 550  |
| pH                                   | 5,6                                     | 5,6  |

**Catatan:** \*Larutan enzim disterilkan dengan cara difilter, dan dapat disimpan pada suhu -20 °C.

\*\*Larutan pencuci protoplas disterilkan dengan menggunakan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.

Selain metode pencucian dan pemurnian yang dijelaskan dalam Fish (1988) diatas, pencucian protoplas yang lebih sederhana juga dapat dilakukan seperti yang dijelaskan dalam Purwito (1999). Protoplas tanaman kentang yang sudah disaring disentrifugasi pada 120 g selama 5 menit. Supernatan dibuang dengan cara dipipet dengan hati-hati, sedangkan endapan protoplas dicuci dengan menggunakan 10 ml larutan pencuci protoplas yang terdiri atas 0,5 M manitol dan 0,05 mM CaCl<sub>2</sub> dan disentrifugasi pada 120 g selama 5 menit. Pencucian

dilakukan dua kali untuk menghilangkan larutan enzim yang masih tersisa. Larutan pencuci protoplas dapat berupa garam dan vitamin dari media MS dengan penambahan  $17 \text{ g L}^{-1}$  NaCl (Chen et al. 2008). Endapan protoplas dimurnikan dengan cara menambahkan  $0,6 \text{ M}$  sukrosa dan disentrifugasi pada  $120 \text{ g}$  selama 10 menit. Protoplas akan mengapung dan terkumpul diatas permukaan larutan sukrosa (karena protoplas lebih ringan masa jenisnya dibandingkan sukrosa). Protoplas yang mengapung dipipet dengan hati-hati dan dicuci kembali dengan menggunakan larutan pencuci protoplas ( $0,5 \text{ M}$  manitol dan  $0,05 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ ) dan disentrifugasi pada  $120 \text{ g}$  selama 5 menit untuk menghilangkan larutan sukrosa yang terdapat pada protoplas. Endapan yang dihasilkan adalah protoplas yang telah dimurnikan.

Protoplas yang telah murni selanjutnya diamati kerapatan dan viabilitasnya (lihat Bab 4) sebelum proses fusi atau kultur dilakukan.

## C. FUSI PROTOPLAS MENGGUNAKAN KEMOFUSI

Teknik kemofusi yang digunakan adalah dengan menggunakan ion calcium dan pH tinggi. Protoplas dari sel mesofil kedua tetua fusi dengan kerapatan  $1 \times 10^6$  per ml dicampur dengan rasio 1: 1. Sebanyak  $0,2 \text{ ml}$  dari campuran suspensi protoplas protoplas tersebut dan disentrifugasi pada  $50 \text{ g}$  selama 5 menit menggunakan tabung sentrifus yang terbuat dari kaca. Supernatan dibuang dan diganti dengan  $2 \text{ ml}$  larutan fusi kalsium dengan pH tinggi (**Tabel 10**). Setelah tercampur dengan baik, sentrifugasi larutan pada  $50 \text{ g}$  selama 3 menit dan kemudian diinkubasi selama 10-15 menit pada suhu  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tabel 10.** Komposisi larutan kemofusi (Fish, 1988)

| <b>Komponen</b>                      | <b>g.L<sup>-1</sup></b> |
|--------------------------------------|-------------------------|
| PEG 6000                             | 200                     |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 35                      |
| Glysin                               | 4                       |
| pH                                   | 10,5                    |

**Catatan:** Larutan disterilkan dengan cara difilter.

Larutan fusi protoplas kemudian dipipet dengan hati-hati dan ditempatkan pada 5 ml larutan kultur protoplas VKCLG (**Tabel 11**), dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Setelah sentrifugasi pada 50 g selama 3 menit, pelet protoplas disuspensikan kembali dalam larutan kultur protoplas VKCLG yang segar untuk mendapatkan kerapatan kultur  $4 \times 10^4$  per ml. Frekuensi fusi dapat dihitung 2-3 jam setelah fusi, dengan formula:

$$\text{Frekuensi fusi (\%)} = \frac{\text{Jumlah protoplas yang berfusi}}{\text{Jumlah protoplas}}$$

Proporsi fusi heterokaryon tidak bisa dibedakan secara langsung dengan fusi homokaryon dalam kasus ini, karena kedua set protoplas tetua fusi tidak dapat dibedakan satu sama lain. Hibrida fusi dapat dibedakan secara langsung pada tahapan ini apabila protoplas kedua tetua diisolasi dari sumber jaringan yang berbeda. Misalnya, protoplasma dari salah satu tetua diisolasi dari sel mesofil (berwarna hijau), sedangkan tetua lainnya diisolasi dari jaringan selain hijau seperti sel kalus (berwarna putih) atau sel petal (berwarna sesuai warna petal dari organ bunga tersebut), sehingga fusi heterokaryon dapat dibedakan secara langsung melalui leburan warna kedua sel tetua, seperti dijelaskan sebelumnya mengenai seleksi hibrida hasil fusi (Bab 7).

**Tabel 11.** Komposisi media kultur protoplasma (Fish, 1988)

| <b>Komponen</b>                                      | <b>VKCLG<br/>mg.L<sup>-1</sup></b> | <b>CLG<br/>mg.L<sup>-1</sup></b> |
|--|------------------------------------|----------------------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1480                               | 4700                             |
| CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                 | 735                                | 1100                             |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 948                                | 950                              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 68                                 | 450                              |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 28                                 | 13,9                             |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 37                                 | 18,5                             |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 3,0                                | 3,0                              |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                 | -                                  | 9,9                              |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 2,0                                | 4,6                              |
| KI   | 0,75                               | 0,42                             |
| Na <sub>2</sub> .MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,25                               | 0,13                             |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                 | 0,025                              | 0,013                            |
| CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                 | 0,025                              | 0,015                            |
| MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O                  | 7,58                               | -                                |
| Innositol  | 100                                | 1,14                             |
| Sorbitol   | 250                                | -                                |
| Fructose   | 250                                | -                                |
| Ribose   | 250                                | -                                |
| Xylose   | 250                                | -                                |
| Mannose  | 250                                | -                                |
| Rhamnose   | 250                                | -                                |
| Cellobiose   | 250                                | -                                |
| Sucrose  | 250                                | -                                |
| Sucrose  | 250                                | 51000                            |
| Glutamine  | -                                  | 100                              |
| Coconut milk   | 20 ml                              | -                                |
| Casein hydrolisat                                    | 250                                | -                                |



| <b>Komponen</b>      | <b>VKCLG<br/>mg.L<sup>-1</sup></b> | <b>CLG<br/>mg.L<sup>-1</sup></b> |
|----------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| MES                  | -                                  | 585                              |
| Sodium pyruvat       | 20                                 | -                                |
| Fumaric acid         | 40                                 | -                                |
| Citric acid          | 40                                 | -                                |
| Malic acid           | 40                                 | -                                |
| Glycin               | -                                  | 2,0                              |
| Nicotinic acid       | -                                  | 5,0                              |
| Thiamine HCl         | 10                                 | 0,5                              |
| Pyridoxine HCl       | 1                                  | 0,5                              |
| Folic acid           | 0,4                                | 0,5                              |
| Biotin               | 0,01                               | 0,05                             |
| D-Ca Panthothenate   | 1                                  | -                                |
| Choline Chloride     | 1                                  | -                                |
| Ascorbic Acid        | 2                                  | -                                |
| p-Amino Benzoic Acid | 0,02                               | -                                |
| Nicotinamide         | 1                                  | -                                |
| Vitamin A            | 0,01                               | -                                |
| Vitamin B3           | 0,01                               | -                                |
| Vitamin B12          | 0,02                               | -                                |
| NAA                  | 1                                  | 1                                |
| BAP                  | 0,4                                | 0,4                              |
| Glucose              | 81.400                             | -                                |
| Mannitol             | 250                                | 28000                            |
| pH                   | 5,6                                | 5,6                              |

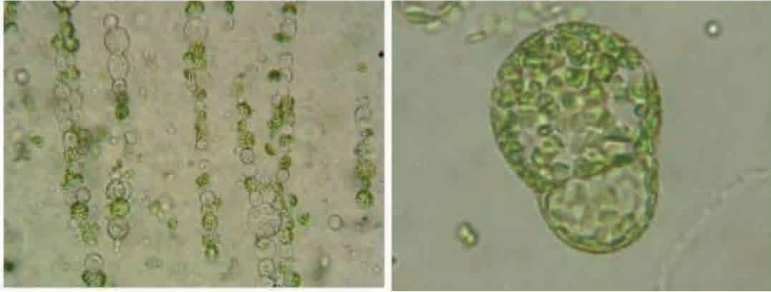
## D. FUSI PROTOPLAS MENGGUNAKAN ELEKTROFUSI

Elektro fusi yang dijelaskan dalam Fish (1988) berikut menggunakan system fusi dari Zimmermann yang disambungkan dengan ruang elektrofusi Krüss lamellar (dengan separasi elektroda 1 mm). Protoplas murni dari sel mesofil yang telah disiapkan diresuspensi dalam larutan pencuci untuk elektrofusi (**Tabel 12**) dengan kepadatan  $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  dan dicampur dalam rasio 1:1. Sebanyak 0,2 ml suspensi protoplas secara hati-hati dialirkan ke ruang elektroda (elektroda *chamber*), dan elektroda dimasukkan. Protoplas disejajarkan selama 20-30 detik dalam medan listrik (1 MHz,  $100\text{-}150 \text{ V cm}^{-1}$ ). Ketika protoplas membentuk rantai 5-10, fusi diinduksi dengan menggunakan pulsa DC ( $1 \times 10 \text{ } \mu\text{sec}$ ,  $1250\text{-}1750 \text{ V cm}^{-1}$ ) (**Gambar 27**), *ramp* dilakukan selama 20 detik untuk menurunkan medan listrik menjadi 0 setelah perlakuan pulsa. Protoplas yang sudah mengalami fusi dipipet dengan hati-hati ke dalam cawan petri dengan diameter 5 cm dan diencerkan dengan larutan kultur protoplasma VKCLG (**Tabel 11**) hingga mencapai kerapatan kultur  $8 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$  dan siap untuk dikulturkan.

**Tabel 12.** Komposisi larutan pencuci elektrofusi (Fish, 1988)

| Komponen                             | mg.L <sup>-1</sup> |
|--------------------------------------|--------------------|
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 147                |
| Mannitol                             | 82.000             |
| pH                                   | 5,6                |

**Catatan:** Larutan disterilkan dengan cara difilter dan dibuat sesaat sebelum digunakan.



**Gambar 27**

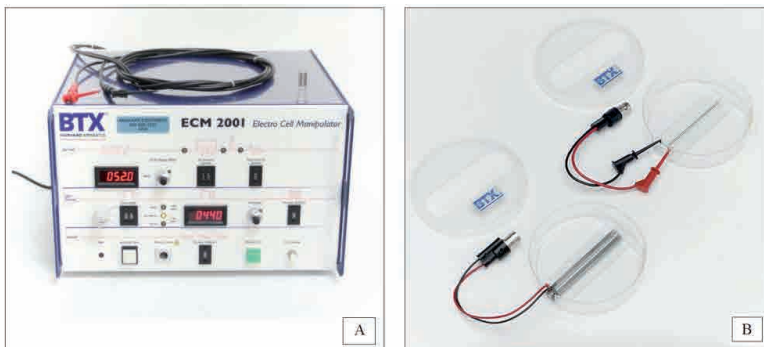
Elektrofusi pada protoplas. Protoplas membentuk rantai pada pulsa AC (kiri); Fusi protoplas pada pulsa AC (kanan)

**Sumber:** [https://www.vubhb.cz/Userfiles/Files/pdf/procedure\\_of\\_protoplast\\_electrofusion.pdf](https://www.vubhb.cz/Userfiles/Files/pdf/procedure_of_protoplast_electrofusion.pdf)

Selain prosedur yang digunakan oleh Fish (1988) yang dijelaskan tersebut diatas, prosedur elektrofusi yang dikembangkan oleh Sihachkr et al. (1988) dalam fusi protoplas tanaman *Solanum melongena* (terong) dan *S. khasianum* juga umum atau sering digunakan pada elektrofusi tanaman dalam genus solanum, termasuk untuk tanaman kentang. Multi-elektroda yang dapat bergerak (*movable*) (elektroda ganda yang berjarak 2 mm) ditempatkan dalam cawan petri berukuran 15 × 50 mm, yang mengandung mengandung 500-700  $\mu\text{l}$  alikuoat campuran protoplas dari kedua tetua fusi, dengan perbandingan 1:1. Protoplas disejajarkan selama 15 detik dengan menggunakan medan listrik arus bolak balik AC 125 V  $\text{cm}^{-1}$  dan 1 MHz; selanjutnya, pulsa dengan amplitudo 1,2 kV  $\text{cm}^{-1}$  diberikan 3-4 kali selama 20  $\mu\text{s}$  agar terjadi fusi protoplas. Setelah perlakuan pulsa, medan listrik AC dikurangi secara rutin menjadi 20 V  $\text{cm}^{-1}$  untuk menjaga agar rantai protoplast tetap lurus. Untuk memperkirakan

frekuensi fusi dapat dilakukan dengan mengamati peristiwa fusi melalui *inverted* mikroskop. Frekuensi protoplas yang didapatkan dengan metode ini berkisar antara 30–40%, dimana sedikitnya 30 % dari frekuensi tersebut adalah fusi biner (Sihachakr et al. 1988).

Metode elektrofusi yang dikembangkan oleh Shi et al. (2005) juga dianggap efisien dalam fusi protoplas tanaman kentang. Elektrofusi dilakukan dengan menggunakan ECM 2001 Electro Manipulator Sel (**Gambar 28 A**). Protoplas kedua tetua dicampur dalam rasio 1:1 dalam larutan yang mengandung 0,4 M manitol dan 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , pada kerapatan akhir  $3 \times 10^5$  protoplas  $\text{mL}^{-1}$ . Larutan kemudian disimpan/diinkubasi di es selama sekitar 30 menit. Sebanyak 500  $\mu\text{l}$  dari suspensi protoplas tersebut dimasukkan ke dalam kuvet elektroporasi yang memiliki celah 3,2 mm (**Gambar 28 B**). Protoplas disejajarkan pada arus AC  $50 \text{ V cm}^{-1}$  selama 30 detik, diikuti oleh dua pulsa berturut-turut masing-masing 60  $\mu\text{s}$  pada  $1,3 \text{ kV cm}^{-1}$ . Setelah fusi, protoplas dibiarkan dalam kuvet selama 10 menit sebelum dipindahkan untuk diregenerasikan.



**Gambar 28**

Peralatan yang digunakan dalam elektrofusi. A. ECM 2001 Electro Manipulator Sel; B. Kuvet elektroporasi

## E. KULTUR PROTOPLAS DAN REGENERASI TANAMAN

Hasil fusi protoplas yang sudah diencerkan dengan larutan kultur protoplasma diregenerasikan dalam cawan petri dengan diameter 5 cm dan diinkubasi pada 25 ° C dalam gelap. Setelah 6 hari, kepadatan protoplas dikurangi menjadi  $1,7 \times 10^3 \text{ ml}^{-1}$  dengan penambahan 4 ml larutan media CLG untuk mendorong pembelahan protoplas (**Tabel 11**). Tekanan osmotik media kultur secara bertahap dikurangi dengan memindahkan 6,5 ml suspensi protoplas ke dalam petridish yang berdiameter 9 cm yang berisi media CLG yang dipadatkan dengan agar 0,4% (**Tabel 11**). Setelah 10 hari kultur dipindahkan ke ruang cahaya pada 25 ° C. Setelah 25-30 hari setelah isolasi, koloni kecil hasil regenerasi protoplas dapat terlihat dengan mata telanjang. Sebanyak 3 ml alikuot kemudian dipindahkan ke media regenerasi protoplas (Media Cg, **Tabel 13**) selama 6 hari.

Setelah 6 hari, kalus dipindahkan ke media regenerasi Cg segar selama 20 hari dengan penyinaran sepanjang hari (24 jam sehari) pada 20°C. Kalus akan tumbuh dengan cepat dan menjadi berwarna hijau muda. Setelah total 26 hari pada media Cg, kalus dipindahkan ke media regenerasi D (**Tabel 13**) selama 42 hari. Pada periode ini, kalus akan menjadi hijau tua dan primordia pucuk kecil mulai muncul.

**Tabel 13.** Komposisi media regenerasi protoplas (Fish, 1988)

| Komponen                             | Media CG           | Media D            |
|--------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                                      | mg.L <sup>-1</sup> | mg.L <sup>-1</sup> |
| NH <sub>4</sub> N <sub>3</sub>       | 107                | 267,5              |
| KNO <sub>3</sub>                     | 1900               | 1900               |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 440                | 440                |

| <b>Komponen</b>                                      | <b>Media CG<br/>mg.L<sup>-1</sup></b> | <b>Media D<br/>mg.L<sup>-1</sup></b> |
|--|---------------------------------------|--------------------------------------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 170                                   | 170                                  |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub>                   | 370                                   | 370                                  |
| Na <sub>2</sub> EDTA                                 | 18,5                                  | 18,5                                 |
| FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 13,9                                  | 13,9                                 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 3,1                                   | 3,1                                  |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                 | 9,9                                   | 9,9                                  |
| ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 4,6                                   | 4,6                                  |
| KI   | 0,42                                  | 0,42                                 |
| Na <sub>2</sub> .MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,13                                  | 0,13                                 |
| CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                 | 0,013                                 | 0,013                                |
| CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                 | 0,015                                 | 0,015                                |
| Thiamine HCl   | 0,5                                   | 0,5                                  |
| Glycin   | 2                                     | 2                                    |
| Nicotinic acid                                       | 5                                     | 5                                    |
| Pyridoxine HCl                                       | 0,5                                   | 0,5                                  |
| Folic acid   | 0,5                                   | 0,5                                  |
| Biotin   | 0,05                                  | 0,05                                 |
| Adenine sulphate                                     | 40                                    | 80                                   |
| Myo-inositol   | 100                                   | 100                                  |
| Glutamine  | 100                                   | 146                                  |
| Sukrosa (gula)                                       | 2.500                                 | 2.500                                |
| Mannitol   | 54600                                 | 36430                                |
| MES  | 976                                   | 976                                  |
| NAA  | 0,1                                   | -                                    |
| BAP  | 0,5                                   | -                                    |
| IAA  | -                                     | 0,1                                  |
| Zeatin   | -                                     | 1,0                                  |
| Agar   | 10000                                 | 10000                                |
| pH   | 5,6                                   | 5,6                                  |

Primordia pucuk yang terlihat pada medium D diinduksi untuk memanjang dengan memindahkan kalus ke media pemanjangan tunas, yaitu media MS (**Tabel 7**) dengan penambahan  $0,25 \text{ mgL}^{-1}$  BAP +  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  GA3 +  $10 \text{ gL}^{-1}$  agar (pH 5,6). Tunas akan memanjang dengan cepat pada media pemanjangan tunas tersebut.

Setelah 18 hari kemudian, tunas yang berukuran 3-5 cm dipisahkan dan dipindahkan ke media MS (**Tabel 7**) dengan penambahan  $0,05 \text{ mgL}^{-1}$  BAP +  $10 \text{ gL}^{-1}$  agar (pH 5,6) dalam botol kultur berukuran 60 ml (atau wadah plastik steril). Tunas tumbuh dengan cepat dan diinduksi untuk pertumbuhan akar dengan mentransfer tunas ke media perakaran yang terdiri atas media MS +  $0,05 \text{ mgL}^{-1}$  NAA +  $10 \text{ gL}^{-1}$  agar, pada pH 5,6. Selanjutnya plantlet dapat di aklimatisasi dan ditumbuhkan di rumah kaca, serta dianalisa secara sitologi untuk memverifikasi hibrida somatik yang dihasilkan (lihat Bab 9).

Kultur protoplas dapat juga dilakukan menggunakan media yang dipakai dalam penelitian Ehsanpour dan Jones (2001). Protoplas dikulturkan pada kerapatan  $3-4 \times 10^4$  per ml menggunakan media kultur protoplas (media A, **Tabel 14**) dengan pematat berupa 0,45% agarosa tipe VII (gel yang terbentuk pada suhu rendah). Untuk mengkulturkan protoplas pada petri dish, sebanyak 1 ml dari media A (pada konsentrasi dua kali lipat/ *double strength*) dicampurkan dengan 1,8% agarosa pada suhu  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , di tambahkan pada 1 ml suspensi protoplas yang terdapat diatas petri dish (diameter 5 cm). Campur dengan rata suspensi protoplas dan larutan agarosa tersebut. Petri dish ditutup dengan *Nescofilm* dan diinkubasi pada kondisi gelap pada suhu  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Protoplas akan membelah setelah 8-10 hari kemudian. Efisiensi *plating* protoplas dapat dihitung setelah 3-4 minggu dikulturkan, dimana koloni kecil sudah mulai terbentuk. Untuk mencegah terjadinya *browning* (pencoklatan), protoplas yang dikulturkan pada

gel agarose tersebut dipotong potong menjadi ukuran-ukuran kecil dan dipindahkan ke media pembentukan kalus cair (media C, Tabel 14), dan digoyang pada 40 rpm. Setelah 5-6 minggu kalus kecil berukuran 1-2 mm dipindahkan ke media induksi tunas (media S, Tabel 14). Setelah 6-8 minggu, tunas kecil dipindahkan ke media pengakaran (media R, Tabel 14) untuk pemanjangan tunas dan pembentukan akar. Tunas disubkultur setiap 3-4 minggu pada media MS atau media R. Pada periode ini tanaman dapat dianalisa untuk memverifikasi hibrida somatic yang dihasilkan, serta dilanjutkan untuk proses aklimatisasi dan penanaman di lapangan/rumah kaca.

**Tabel 14.** Komposisi media kultur protoplas (Media A), pembentukan kalus (Media C), induksi pucuk (Media S), dan induksi akar (Media R). Sumber: Ehsanpour dan Jones (2001)

| <b>Komponen</b>   | <b>Media A<br/>(mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Media C<br/>(mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Media S<br/>(mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Media R<br/>(mg.L<sup>-1</sup>)</b> |
|-------------------|--|--|--|--|
| Unsur makro       | MS                                     | MS                                     | MS                                     | MS                                     |
| Unsur mikro       | MS                                     | MS                                     | MS                                     | MS                                     |
| <b>Vitamin</b>    |  |  |  |  |
| Glycin            | 2                                      | 2                                      | 2                                      | 2                                      |
| Myo-inositol      | 100                                    | 100                                    | 100                                    | 100                                    |
| Nicotinic acid    | 5                                      | 5                                      | 5                                      | 5                                      |
| Pyridoxine HCl    | 0,5                                    | 0,5                                    | 0,5                                    | 0,5                                    |
| Folic acid        | 0,5                                    | 0,5                                    | 0,5                                    | 0,5                                    |
| Biotin            | 0,05                                   | 0,05                                   | 0,05                                   | 0,05                                   |
| Casein-Hydrolisat | 500                                    | 400                                    | -                                      | -                                      |
| Adenine sulphate  | 40                                     | 40                                     | 80                                     | 80                                     |
| Glutamine         | -                                      | 100                                    | 146                                    | -                                      |
| Air kelapa        | 20 ml.L <sup>-1</sup>                  | -                                      | -                                      | -                                      |



| <b>Komponen</b>  | <b>Media A<br/>(mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Media C<br/>(mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Media S<br/>(mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>Media R<br/>(mg.L<sup>-1</sup>)</b> |
|------------------|--|--|--|--|
| <b>Hormon</b>    |  |  |  |  |
| NAA              | 1                                      | 0,1                                    | -                                      | -                                      |
| BAP              | 0,5                                    | 0,5                                    | -                                      | -                                      |
| IAA              | -                                      | -                                      | 0,1                                    | -                                      |
| Zeatin           | -                                      | -                                      | 1                                      | -                                      |
| <b>Lain-lain</b> |  |  |  |  |
| MES              | 976                                    | 976                                    | 976                                    | -                                      |
| Mannitol         | -                                      | 4 %                                    | 3 %                                    | -                                      |
| Glukosa          | 7,5 %                                  | -                                      | -                                      | -                                      |
| Agarosa type VII | 0,45 %                                 | -                                      | -                                      | -                                      |
| Sukrosa          | 2,5 g.L <sup>-1</sup>                  | 2,5 g.L <sup>-1</sup>                  | 2,5 g.L <sup>-1</sup>                  | 30 g.L <sup>-1</sup>                   |
| Agar             | -                                      | 7 g.L <sup>-1</sup>                    | 7 g.L <sup>-1</sup>                    | 7 g.L <sup>-1</sup>                    |
| pH               | 5,6                                    | 5,6                                    | 5,6                                    | 5,8                                    |

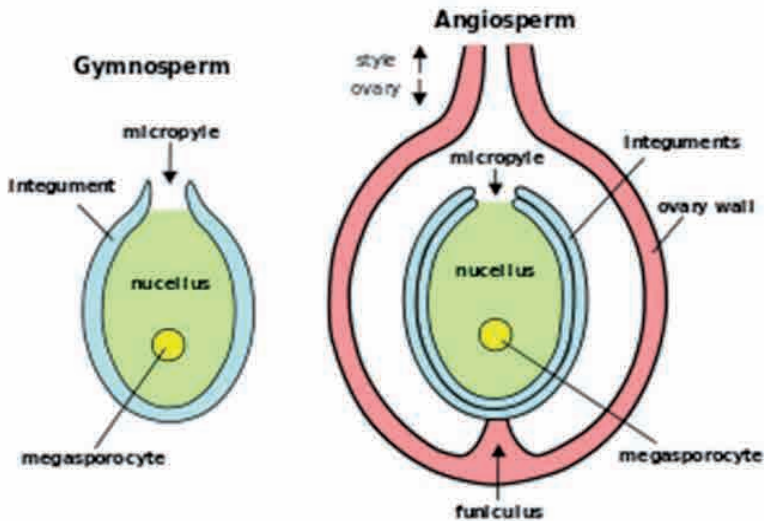
# PROTOKOL FUSI PROTOPLAS PADA TANAMAN JERUK

Pada tanaman jeruk, teknik fusi protoplas berkembang dengan sangat baik. Teknik ini memberikan sumbangan yang sangat signifikan didalam program pengembangan tanaman jeruk. Hibridisasi somatik tanaman jeruk umumnya diproduksi menggunakan protoplas yang berasal dari kalus embriogenik atau dari kultur suspensi sebagai tetua pertama dan protoplas yang berasal dari sel daun sebagai tetua kedua. Setidaknya salah satu tetua untuk fusi protoplas pada tanaman ini harus bersumber dari sel embriogenik untuk memudahkan regenerasi hasil fusi menjadi tanaman.

Protokol fusi protoplas pada tanaman jeruk berikut disadur dari Grosser and Gmitter (2011). Protokol ini telah berhasil memproduksi hibrida somatik dari hampir 300 kombinasi tetua, yang dikembangkan di Universitas Florida, *Citrus Research and Education Center* (Pusat Pendidikan dan Penelitian tanaman Jeruk), Lake Alfred, FL, USA. Metoda ini juga dapat digunakan pada tanaman lain dalam genus dan spesies yang berbeda, seperti pada tanaman alpukat (Witjaksono et al. 1998) dan anggur (Xu et al. 2007) dengan modifikasi minor.

## A. INDUKSI DAN PEMELIHARAAN KALUS EMBRIOGENIK DAN KULTUR SUSPENSII

Kalus embriogenik pada tanaman jeruk dapat diinisiasi dari jaringan nuselus dari ovul (jaringan bakal biji) yang belum berkembang (**Gambar 29**). Ovul tersebut dapat diperoleh baik dari buah yang belum matang atau sudah matang. Pertama-tama permukaan buah disterilisasi, kemudian di dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC) dalam kondisi aseptik ovul pada buah tersebut diambil sebagai sumber eksplan dan dikulturkan dalam media EME + 5 mg/l kinetin (**Tabel 15**), untuk induksi kalus.



**Gambar 29**

Jaringan nusellus pada biji tanaman gymnospermae (kiri) dan angiosperame (kanan).

Kultur ovul harus disubkultur setiap 3-4 minggu sampai kalus putih atau kuning muncul dari ovul. Pada beberapa kasus, perkembangan kalus akan diikuti oleh proliferasi embrio somatik, dan kalus globular harus segera dipisahkan dari embrio somatik agar kalus dapat terus berproliferasi. Induksi kalus pada kultur ovul umumnya tidak efisien, diperlukan ovul dalam jumlah besar (beberapa ratus) untuk setiap kultivar. Proliferasi kalus yang remah harus disubkultur setiap 4 minggu. Setelah jumlah yang signifikan dari kalus diperoleh, kalus selanjutnya dapat disubkultur pada media EME tanpa zat pengatur tumbuh atau media H+H (**Tabel 15**). Pada tahapan ini, setiap galur kalus yang didapatkan harus di analisis dengan penanda genetik/ penanda molekular, untuk menjamin bahwa kalus yang didapat berkembang dari nuselus bukan berasal dari embrio zygotik, karena kadang-kadang kalus embriogenik yang didapatkan ternyata bisa saja berasal dari embrio zygotik yang terdapat pada ovul (Chen et al. 2008). Umumnya membutuhkan waktu satu tahun untuk mendapatkan jumlah kalus embriogenik yang memadai untuk inisiasi suspensi.

Kultur suspensi dimulai dengan menggunakan sekitar 2 g jaringan kalus yang dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer berukuran 125-ml yang mengandung 20 ml media H+H cair (**Tabel 15**). Kultur suspensi kemudian di *shaker* (digoyang) terus menerus pada rotary shaker pada 125-150 rpm. Setelah 2 minggu, tambahkan media H+H cair sebanyak 20 ml pada setiap tabung sehingga jumlah larutan pada masing-masing tabung menjadi 40 ml. Kultur suspensi berkembang cukup cepat dan setiap 2 minggu dapat dilakukan subkultur, dengan membagi isi dari satu tabung menjadi dua tabung dengan media H+H yang baru sebanyak 40 ml.

## B. ISOLASI PROTOPLAS

Sel-sel yang digunakan untuk isolasi protoplas, baik yang berasal dari kalus embriogenik atau kultur suspensi, harus berada dalam fase log dari pertumbuhan, dengan hasil terbaik menggunakan sel dari kultur suspensi berumur 4 sampai 12 hari pada subkultur 2 minggu. Masukkan 1-2 g jaringan kalus yang remah kedalam petri dish yang berukuran 60 x 15 mm (untuk kalus suspensi, gunakan sekitar 2 ml suspensi dengan menggunakan pipet bermulut lebar dan pipet Pasteur). Sel diresuspensi dalam media BH3 sebanyak 2,5 ml 0,7 M (**Tabel 16**; BH3 + 34 g/l sukrosa) dan kemudian tambahkan 1,5 ml larutan enzim yang mengandung 0,7 M manitol, 12,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 6.0 mM MES penyangga, 1,4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2% Onozuka RS selulase, 2% Macerace, pada pH 5.6 dan steril filter (sterilisasi dengan menggunakan filter berupa *millipore*, jangan diautoklav! karena larutan enzim bisa rusak atau terganggu fungsinya apabila dipanaskan pada suhu tinggi). Selanjutnya petri *diseal* (ditutup bagian pinggirnya) dengan Nescofilm/parafilm dan diinkubasi semalam dengan dishaker perlahan pada 20 rpm, pada intensitas cahaya rendah atau dalam ruang gelap.

Untuk sumber protoplas donor yang berasal dari sel daun, daun yang digunakan merupakan daun yang helaianya telah terbuka penuh namun belum mengeras. Daun harus diambil dari tanaman yang dipelihara dan tumbuh dengan baik dirumah kaca yang ternaungi. Alternatif yang lain yang dapat digunakan adalah menggunakan daun yang berasal dari tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* atau kultur jaringan. Daun dari tanaman yang berasal dari kultur jaringan ini mempunyai keunggulan karena bebas dari kontaminasi, sehingga tidak perlu disterilisasi terlebih dahulu sebelum proses isolasi protoplas.

Daun tanaman yang bersumber dari rumah kaca harus disterilisasi terlebih dahulu dengan cara merendam daun dalam larutan HCl 1 N selama beberapa detik dan diikuti dengan perendaman selama 12-15 menit dalam larutan klorox atau cairan pemutih komersial 10-15% (6% sodium hypochlorite) yang mengandung 3 tetes sabun *Liquinox* atau sejenis surfaktan lainnya. Kemudian dicuci dengan aquades steril selama 5-min dan dibilas dua kali masing-masing selama 10-min dengan aquades steril.

Jaringan vaskular dan urat daun yang rusak harus dibuang dengan menggunakan pisau scalpel yang tajam. Daun selanjutnya dipotong tipis dengan pisau scalpel tajam dan diinkubasi dalam larutan enzim 3 ml (seperti larutan enzim yang digunakan untuk mengisolasi protoplas dari kultur suspensi di atas), yang dikombinasikan dengan 8 ml media BH3 0,7 M dalam tabung elemeyer 125 ml (bagian tutup botol ditutup untuk mencegah kontaminasi). Potongan daun dalam larutan enzim tersebut diinkubasi selama 15 menit pada 50 kPa untuk memfasilitasi infiltrasi enzim. Perlu dicatat bahwa kalus muda/kultur suspensi yang baru terdiri dari sel-sel dengan kadar pati tinggi. Hal ini dapat mengurangi jumlah dan viabilitas protoplas yang dihasilkan karena tingginya tingkat kerusakan protoplas. Masalah ini dapat diminimalisir dengan melakukan subkultur secara kontinyu.

## C. PURIFIKASI PROTOPLAS

Setelah protoplas diinkubasi pada larutan enzim (isolasi protoplas), protoplas dipurifikasi/dimurnikan dengan menyaring protoplas pada gradien mannitol atau sukrosa menggunakan saringan dari stainless steel yang berukuran 45  $\mu\text{m}$  atau dengan menggunakan saringan nilon. Proses penyaringan ini dilakukan untuk memisahkan protoplas dari gumpalan sel yang tidak terdigesti dan debris dari sel yang rusak.

Filtrat yang mengandung protoplas dimasukkan dalam tabung 15 ml (plastik/effendorf) kemudian disentrifugasi selama 4-10 menit pada 100 g. Supernatan diambil dengan pipet Pasteur, dan pelet yang mengandung protoplas kemudian disuspensi perlahan dengan 5 ml larutan CPW nutrisi ( $27,2 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $100 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KNO}_3$ ,  $150 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ ,  $250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ MgSO}_4$ ,  $2,5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,16 \text{ mg.L}^{-1} \text{ KI}$ ,  $0,00025 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CuSO}_4$ , pH 5,8) (Frearson et al. 1973) yang mengandung sukrosa 25%. Proses ini diikuti dengan memipet secara perlahan 2 ml larutan manitol 13% (mengandung CPW garam) dan dituangkan langsung di atas lapisan larutan sukrosa (hindari terjadinya pencampuran larutan). Selanjutnya larutan disentrifuse selama 6 menit pada 100 g. Protoplas yang viabel membentuk sebuah lapisan antara sukrosa dan manitol. Pisahkan protoplas dengan hati-hati dan resuspensi dalam larutan media BH3 untuk persiapan fusi somatik.

## D. FUSI PROTOPLAS (MENGUNAKAN METODA PEG)

Protokol fusi protoplas tanaman yang cukup sederhana, efisien, murah dan tidak beracun dapat dilakukan dengan menggunakan bahan kimia PEG (polyethylene glycol). Protoplas dicampur pada media BH3 (**Tabel 16**) yang sudah dimurnikan (sudah dipurifikasi) dengan volume yang sama antara protoplas dari setiap donor (dari kedua tetua) dan disentrifuse selama 4 menit pada 100 g. Pelet dari campuran protoplas tersebut diresuspensi dalam 4 x sampai 20 x volume media BH3 (10 x volume lebih disarankan untuk eksperimen awal, dengan penyesuaian berikutnya berdasarkan efisiensi plating dari larutan

yang diperoleh). Pipet dua tetes campuran yang telah diresuspensi dengan baik kedalam petridish steril (dishposable petridish steril) berukuran 60 x 15 cm. Segera tambahkan 2 tetes larutan PEG segar (40% polietilen glikol BM 8000, 0,3 M glukosa, dan 66 mM  $\text{CaCl}_2$  pada pH = 6) untuk setiap Petridish dan diinkubasi selama 8 menit. Jika menggunakan larutan PEG yang tidak segar (sudah disimpan untuk beberapa waktu, disarankan untuk menyesuaikan pH larutan). Tambahkan 2 tetes larutan A+B (dengan perbandingan 9: 1 v: v dicampur sebelum digunakan, A = 0,4 M glukosa, 66 mM  $\text{CaCl}_2$ , dan 10% dimetilsulfoksida pada pH = 6; dan B = 0,3 M glisin pada pH = 10,5 gunakan KOH untuk menyesuaikan pH) untuk setiap Petridish, inkubasi larutan selama 12 menit. Selanjutnya tambahkan 12-15 tetes media BH3 pada larutan fusi protoplas (pada bagian pinggir petri) dan diinkubasi selama 5 menit. Secara perlahan buang larutan PEG *plus* [A+B] dengan menggunakan pipet (tanpa mengambil protoplas) dan ganti dengan 15 tetes media BH3. Setelah diinkubasi selama 10 menit, buang media BH3 dengan menggunakan pipet Pasteur dengan hati-hati dan ganti larutan dengan 12-15 tetes media BH3 segar. Ulangi langkah pencucian ini sebanyak dua kali, untuk setiap tahapan harus selalu berhati-hati untuk menghindari terambil dan hilangnya protoplas. Setelah tahap pencucian terakhir, protoplas dapat langsung dikulturkan pada petridish atau didalam botol kultur yang tidak terlalu dalam (untuk 8-12 tetes media atau 1,5 ml ) pada media BH3, EMEP (**Tabel 16**), atau campuran media BH3 dan EMEP dengan perbandingan 1:1 (v:v). Selanjutnya petridish *diseal* (ditutup bagian pinggirnya) dengan menggunakan Parafilm, dan diinkubasi pada ruang gelap atau ruangan dengan intensitas cahaya yang rendah. Akan lebih baik lagi jika pada saat inkubasi tersebut, petridish dimasukkan di dalam kotak plastik steril yang ditutup rapat.



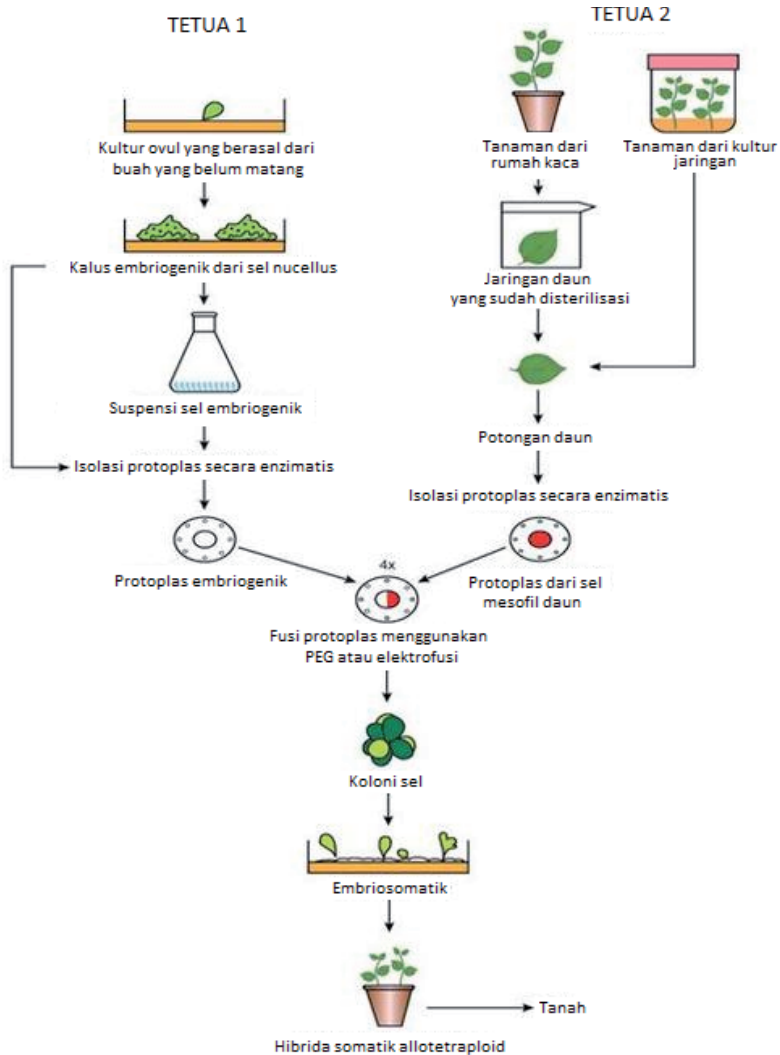
## E. KULTUR PROTOPLAS DAN REGENERASI TANAMAN

Setelah kultur protoplas di inkubasi selama 4-6 minggu, tambahkan media yang dapat mengurangi tekanan osmotikum, dengan menambahkan 10-12 tetes campuran media BH3 dan 0.38 M EME dengan perbandingan antara BH3:EME sebesar 1: 2 (v: v) (**Tabel 15**, EME + 76,7 g/l sukrosa). Setelah diinkubasi selama 2 minggu kultur protoplas tersebut dipindahkan ke media padat (media EME-maltosa yang mengandung 50 g/l maltosa bukan sukrosa dengan penambahan agar untuk memadatkan media) dalam petridish yang berukuran 10 x 2 cm, dengan pemberian 2 ml media penurun osmotikum (campuran media BH3 dan media EME cair dengan perbandingan 1:2 (v:v) (**Tabel 15**)) dan dituangkan kedalam setiap petridish yang telah berisi media EME-Maltosa padat, untuk menginduksi embriosomatik. Cairan media yang mengandung koloni dari protoplas harus tersebar secara merata di seluruh petri, membentuk lapisan yang dangkal, karena terlalu banyak media cair akan menenggelamkan koloni protoplas yang tumbuh. Kultur yang tumbuh dan berkembang dengan baik memerlukan pengenceran untuk menginduksi terbentuknya embrio somatik. Embrio somatik selanjutnya ditumbuhkan pada media pembesaran dan media perkecambahan (media B+, **Tabel 15**). Seringkali, embrio yang didapatkan abnormal dan gagal untuk berkecambah. Untuk kasus ini, embrio yang abnormal tersebut dapat dibelah atau dibagi menjadi beberapa bagian-bagian besar dan dikulturkan pada media DBA3 untuk induksi tunas (**Tabel 15**). Tunas yang dihasilkan diinduksi untuk membentuk akar pada media RMAN (**Tabel 15**). Ketika embrio menghasilkan akar tapi tidak membentuk tunas, embrio tersebut bisa dipotong untuk menghilangkan jaringan

yang abnormal, dan dikulturkan kembali baik pada media DBA3 atau RMAN untuk menginduksi terbentuknya tunas adventif dan menjadi tanaman utuh.

## F. VALIDASI HASIL FUSI PROTOPLAS

Sebelum dipindah ke tanah, planlet dapat diseleksi dan ditentukan tingkat ploidinya menggunakan alat *flow cytometry* (Nurhasanah, 2011). Jika sumber protoplas berasal dari kultur suspensi yang diperoleh dari kalus yang baru berinisiasi yang memiliki totipotensi yang tinggi, maka tanaman yang dihasilkan seringnya adalah tanaman diploid yang berasal dari regenerasi protoplas yang belum mengalami fusi. Dalam kasus tersebut, sebagian besar populasi tanaman yang beregenerasi perlu untuk dipulihkan menjadi tanaman tetraploid. Kultur yang berumur lebih tua (biasanya lebih dari 3 tahun) cenderung untuk kehilangan totipotensinya, dan umumnya terjadi peningkatan persentase tanaman yang tetraploid yang berasal dari hibridisasi somatik (fusi protoplas). Tanaman yang telah berakar dengan baik dapat diaklimatisasi dengan dipindahkan ke dalam pot yang berisi media tanam dan di ditumbuhkan pada kelembaban tinggi selama 2-3 minggu. Tanaman tetraploid yang telah beradaptasi dengan baik selanjutnya dianalisa secara molekuler untuk menentukan apakah mereka hasil hibrida somatik yang autotetraploid (hasil fusi dari protoplas dari galur yang sama) atau allotetraploid (hasil fusi dari protoplas dari galur yang berbeda). Keduanya memiliki nilai potensial untuk program pemuliaan tanaman berikutnya. Secara umum, teknik fusi protoplas ini dapat dijelaskan seperti pada **Gambar 30**.



**Gambar 30**

Gambaran umum teknik fusi protoplas.

sumber: <http://biology4isc.weebly.com/1-crop-improvement.html>,  
yang dimodifikasi

**Tabel 15.** Media kultur jaringan tanaman jeruk, mulai dari kultur kalus embriogenik sampai regenerasi tanaman (pH = 5.8), Grosser dan Gmitter (1990)

| Komponen         | Konsentrasi (mg.L <sup>-1</sup> )    |                                      |                         |                   |                      |  |
|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|--|
|                  | EME <sup>a</sup> (kalus embriogenik) | H+H <sup>b</sup> (Kalus embriogenik) | B (Perkembangan embrio) | RMAN (Pengakaran) | DBA3 (Induksi pucuk) |  |
| NH4N03           | 1650                                 | 825                                  | 1650                    | 825               | 1650                 |  |
| KN03             | 1900                                 | 950                                  | 1900                    | 950               | 1900                 |  |
| KH2PO4           | 170                                  | 170                                  | 170                     | 85                | 170                  |  |
| MgSO47H2O        | 370                                  | 370                                  | 370                     | 185               | 370                  |  |
| CaCl22H2O        | 440                                  | 440                                  | 440                     | 440               | 440                  |  |
| Na2 EDTA         | 37,3                                 | 37,3                                 | 37,3                    | 37,3              | 37,3                 |  |
| FeSO47H2O (EDTA) | 27,8                                 | 27,8                                 | 27,8                    | 27,8              | 27,8                 |  |
| MnSO4H2O         | 22,3                                 | 22,3                                 | 22,3                    | 11,15             | 22,3                 |  |
| ZnSO47H2O        | 8,6                                  | 8,6                                  | 8,6                     | 4,3               | 8,6                  |  |
| H3BO3            | 6,2                                  | 6,2                                  | 6,2                     | 3,1               | 6,2                  |  |
| KCl              | -                                    | 750                                  | -                       | -                 | -                    |  |
| KI               | 0,83                                 | 0,83                                 | 0,83                    | 0,42              | 0,83                 |  |
| Na2 MoO42H2O     | 0,25                                 | 0,25                                 | 0,25                    | 0,13              | 0,25                 |  |
| CuSO45H2O        | 0,025                                | 0,025                                | 0,025                   | 0,013             | 0,025                |  |
| CoCl26H2O        | 0,025                                | 0,025                                | 0,025                   | 0,013             | 0,025                |  |

| Komponen          | Konsentrasi (mg.L <sup>-1</sup> )    |                                      |                          |                     |                      |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|
|                   | EME <sup>a</sup> (kalus embriogenik) | H+H <sup>b</sup> (Kalus embriogenik) | B (Perkecambahan embrio) | RMAN (Pengkaran)    | DBA3 (Induksi pucuk) |
| Glutamine         | -                                    | 1550                                 | -                        | -                   | -                    |
| Thiamine HCl      | 10                                   | 10                                   | 10                       | 5                   | 10                   |
| Pyridoxine HCl    | 10                                   | 10                                   | 10                       | 5                   | 10                   |
| Nicotinic acid    | 1                                    | 1                                    | 1                        | 0,5                 | 1                    |
| Myo-inositol      | 100                                  | 100                                  | 100                      | -                   | -                    |
| Malt extract      | 500                                  | 500                                  | -                        | -                   | 1500                 |
| Giberellic acid   | -                                    | -                                    | 1                        | -                   | -                    |
| 2,4-D             | -                                    | -                                    | -                        | -                   | 0,01                 |
| Benzylaminopurine | -                                    | -                                    | -                        | -                   | 3                    |
| NAA               | -                                    | -                                    | -                        | (0,02) <sup>c</sup> | 0,02                 |
| Arang aktif       | -                                    | -                                    | -                        | 500                 | -                    |
| Sucrose (gula)    | 50.000                               | 50.000                               | 25.000                   | 25.000              | 25.000               |
| Agar              | 8                                    | 8                                    | 8                        | 8                   | 8                    |
| Air kelapa        | -                                    | -                                    | -                        | -                   | 20 ml/L              |

**Catatan:** <sup>a</sup> Untuk EME-maltose, ganti sukrosa (gula) dengan maltosa 50.000 mg/l, Untuk EME1500 media pembesaran embrio tingkatkan malt ekstrak tiga kali lipat, <sup>b</sup> untuk media suspensi, tidak menggunakan agar, <sup>c</sup> Opsional (boleh digunakan boleh tidak).

**Tabel 16.** Media kultur protoplas tanaman jeruk

| <b>Komponen</b>                                    | <b>BH3 (mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>EMEP (mg.L<sup>-1</sup>)</b> |
|--|--------------------------------|---------------------------------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                    | -                              | 1650                            |
| KNO <sub>3</sub>                                   | -                              | 1900                            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                    | 170                            | 170                             |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 370                            | 370                             |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O                | 440                            | 440                             |
| Na <sub>2</sub> EDTA                               | 37,3                           | 37,3                            |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 27,8                           | 27,8                            |
| MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O                | 22,3                           | 22,3                            |
| ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                | 8,6                            | 8,6                             |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                     | 6,2                            | 6,2                             |
| KCl  | 1500                           | -                               |
| KI   | 0,83                           | 0,83                            |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O | 0,25                           | 0,25                            |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                | 0,025                          | 0,025                           |
| CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O                | 0,025                          | 0,025                           |
| Glutamine  | 3100                           | -                               |
| Thiamine HCl                                       | 10                             | 10                              |
| Pyridoxine HCl                                     | 10                             | 10                              |
| Myo-inositol                                       | 100                            | 100                             |
| Malt extract                                       | 500                            | 500                             |
| Casein hydrolysate                                 | 250                            | -                               |
| Nicotinic acid                                     | 1                              | 1                               |
| Mannitol   | 81900                          | -                               |
| Sukrosa  | 51320                          | 205400                          |
| Air kelapa   | 20ml/L                         | -                               |
| Fructose   | 250                            | 250                             |
| Ribose   | 250                            | 250                             |
| Xylose   | 250                            | 250                             |
| Mannose  | 250                            | 250                             |
| Rhamnose   | 250                            | 250                             |

| <b>Komponen</b>              | <b>BH3 (mg.L<sup>-1</sup>)</b> | <b>EMEP (mg.L<sup>-1</sup>)</b> |
|------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Cellobiose                   | 250                            | 250                             |
| Galactose                    | 250                            | 250                             |
| Glucose                      | 250                            | 250                             |
| Sodium pyruvate              | 20                             | 20                              |
| Citric acid                  | 40                             | 40                              |
| Malic acid                   | 40                             | 40                              |
| Fumaric acid                 | 40                             | 40                              |
| Vitamin B12                  | 0,02                           | 0,02                            |
| Calcium pantothenate         | 1                              | 1                               |
| Ascorbic acid                | 2                              | 2                               |
| Choline chloride             | 1                              | 1                               |
| p-aminobenzoic acid          | 0,02                           | 0,02                            |
| Folic acid                   | 0,4                            | 0,4                             |
| Riboflavin                   | 0,2                            | 0,2                             |
| Biotin                       | 0,1                            | 0,1                             |
| Vitamin A (retinol)          | 0,01                           | 0,01                            |
| Vitamin D3 (cholecalciferol) | 0,01                           | 0,01                            |

**Catatan:** pH = 5.7, semua media kultur protoplas harus steril filter (jangan diautoklaf)

# DAFTAR PUSTAKA

---

- Abo El-Nil MM, Hildebrandt AC. 1971. Differentiation of virus-symptomless geranium plants from anther callus. *Plant Dis. Rep.*55: 1017–1020
- Aggarwal RK, Sharma DR, Mehra HO, Singh RK. 1983. Isolation and Regeneration of the Mesophyll Protoplasts of *Brassica Juncea* cv. Prakash. In: *Plant Cell Culture in Crop Improvement*. Basic Life Sciences, vol 22. Eds: S.K. Sen, K.L. Giles. Springer, Boston, MA. Pp. 491-494.
- Ahuia MR. 1982. Isolation, culture and fusion of protoplasts: problems and prospects. *Silvae Genetica* 31: 66–77.
- Assani A, Haïcour R, Wenzel G, ForoughiWehr B, Bakry F, Côte FX, Ducreux G, Ambroise A, Grapin A. 2002. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars (*Musa* spp.). *Plant Science* 62: 355-362.
- Avram D, Petcu I, Radu M, Dan F, Stan R. 1992. Electrically induced protoplast fusion for ergosterol producing yeast strain improvement. *Journal of Basic Microbiology* 32: 369-372.
- Bajaj YPS. 1977. Protoplast isolation, culture and somatic cell hybridization. Pages 467–496 in J. Reinert and Y. P. S. Bajaj (eds.). *Plant cell, tissue and organ culture*. Springer-Verlag, Berlin.



- Bhojwani SS, Powar JB, Cocking EL. 1977. Isolation, culture and division of protoplast. *Plant Science Letter* 8: 85-89.
- Binding H, Miegel-Schroeren G, Nehls R. 1986. Protoplast fusion and early development of fusants. In: *Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells*. Eds: J. Reinert and H. Binding. Springer-Verlag, Berlin, Germany. Pp. 37-66.
- Bona CM, Gould JH, Miller JC, Stelly D, Louzada ES. 2009. Citrus asymmetric hybrids produced via fusion of gamma-irradiated and iodoacetamide treated protoplasts. *Pesq. Agropec. Bras.* 44: 454-462.
- Brume MD, Parker VG, Alacemi M, Socici H. 1992. Strain improvement of *Claviceps purpurea* by protoplast fusion without introducing auxotrophic markers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (6): 746-749.
- Byrne SL, Nagy I, Pfeifer M, Armstead I, Swain S, Studer B, Mayer K, Campbell JD, Czaban A, Hentrup S. 2015. A synteny based draft genome sequence of the forage grass *Lolium perenne*. *Plant Journal* 84:816-26.
- Cao X, Guo X, Yang X, Wang H, Hua W, He Y, Kang J, Wang Z. 2016. Transcriptional Responses and Gentiopicroside Biosynthesis in Methyl Jasmonate-Treated *Gentiana macrophylla* Seedlings. *PLoS One* 11(11): e0166493.
- Carlson PS, Smith HH, Dearing RD. 1972. Parasexual interspecific plant hybridisation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America* 69: 2292-2294.

- Chen LP, Zhang MF, Li CS, Hirata Y. 2005. Production of interspecific somatic hybrids between tuber mustard (*Brassica juncea*) and red cabbage (*Brassica oleracea*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80(3): 305-311.
- Chen SB, Tao LZ, Zeng LR, Vega-Sanchez ME, Umemura K, Wang GL. 2006. A highly efficient transient protoplast system for analyzing defence gene expression and protein-protein interactions in rice. *Molecular Plant Pathology* 7:417-427.
- Chatterjee G, Sikdar SR, Das S, Sen K. 1988. Intergeneric somatic hybrid production through protoplast fusion between *Brassica juncea* and *Diploaxis muralis*. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 915-922
- Chen Q, Li HY, Shi YZ, Beasley D, Bizimungu B, Goettel MS. 2008. Development of an effective protoplast fusion system for production of new potatoes with disease and insect resistance using Mexican wild potato species as gene pools. *Canadian Journal of Plant Science* 88: 611-619
- Cheng A, Cui H, Xia G. 2006. Construction of a Primary RH Panel of Italian Ryegrass Genome via UV-Induced Protoplast Fusion. *Plant Biology* 8 (5): 673-679.
- Clarke JHL, Chevre AM, Landgren M, Glimelius K. 1999. Characterization of sexual progenies of male-sterile somatic cybrids between *Brassica napus* and *Brassica tournefortii*. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 605-610.

- Cocking EC. 1960. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature* 187: 962-963.
- Collonnier C, Fock I, Mariska I, Servaes A, Vedel F, SiljakYakovlev S, Souvannavong V, Sihachakr D. 2003. GISH confirmation of somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. torvum*: assessment of resistance to both fungal and bacterial wilts. *Plant Physiol. Biochem.*, 41: 459-470
- Constabel F, Cutler AJ. 1985. Protoplast fusion. In: *Plant Protoplasts*. Eds. L.C. Fowke and F. Constabel. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp. 53-65.
- Das A. Ghosh A. 1989. Breeding by protoplast fusion for glucoamylase production. *Biotechnology Letter* 10:705-708.
- Davey MR, Anthony P, Power JB, Lowe KC. 2005. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology advances* 23(2):131-171.
- De Bona C, Gould J, Miller J, Stelly D, Louzada E. 2009. Citrus Asymmetric Somatic Hybrids Produced via Fusion of Gamma-Irradiated and Iodoacetamide-Treated Protoplasts. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 44 (5): 454-462.
- Dimanov D, Atanassov A. 1989. A Study of the Possibility to Apply UV-Light in Experiments of Somatic Hybridization in Protoplast Cultures of *Nicotiana glauca* and *N. tabacum* (Line Virginia 89). *Genetics and Breeding* 22 (1): 40-44.

- Dimitrova AP, Christov AM. 1992. Electrically induced protoplast fusion using pulse electric fields for dielectrophoresis. *Plant Physiology* 100: 2008-2012.
- Douglas GC, Keller WA, Setterfield G. 1981. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*. II. Protoplast fusion and selection and regeneration of hybrid plants. *Canadian Journal Botany* 59: 220-227.
- Dudits D, Fejer O, Hadlaczky G, Koncz C, Lazar G, Horvath G. 1980. Intergeneric Gene Transfer Mediated by Plant Protoplast Fusion. *Molecular and General Genetics* 179(2): 283-288.
- Eeckhaut T, Van Laere K, De Riek J, Van Huylenbroeck J. 2006. Overcoming Interspecific Barriers in Ornamental Plant Breeding. In: J. Teixeira da Silva. Ed. *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*. Global Science Books, London. Pp. 540-551.
- Earle ED, Cardi T, Dickson MH, Hansen LN, Heath DW, Ren JP, Sigareva M. 1999. Contributions of protoplast fusion to improvement of Brassica crops. In: *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century*. Eds. A. Altman , M. Ziv, S. Izhar . Amsterdam, Kluwer Academic Publisher. Pp. 131-134.
- Ehsanpour AA, Jones MGK. 2001. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* l.) cultivar delaware using silver thiosulfate (STS). *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 12 (2): 103-110.

- El-Bondkly AM. 2006. Gene Transfer between different *Trichoderma* species and *Aspergillus niger* through intergeneric protoplast fusion to convert ground rice straw to citric acid and cellulase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 135:117-132.
- Epen S, Abraham V, Gerdemann M, Schieder O. 1989. Direct Somatic Embryogenesis, Plant Regeneration and Evaluation of Plants Obtained from Mesophyll Protoplasts of *Brassica juncea*. *Annals of Botany* 63(3): 369-372.
- Erikson TR. 1985. Protoplast isolation and culture. In: *Plant Protoplasts*. Eds: L.C. Fowke, F. Canstabel. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp. 1-20.
- Evans DA. 1983. Agricultural application of protoplast fusion. *Nature Biotechnology* 1: 253-261.
- Evans PK, Cocking EC. 1977. *Isolated Plant Protoplast in Plant Tissue and Cell Culture*. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. p. 103-135.
- Fahleson J, Glimelius K. 1999. Protoplast fusion for symmetric somatic hybrid production in Brassicaceae. In: *Plant Cell Protocols*. Ed. R.D. Hall. Totowa, NJ, Humana Press Inc. Pp. 159–209.
- Famelaer I, Verhoeven HA, Dijkhuis P, Ramulu KS. 2007. A Study of the Process of Synchronisation and Micronucleation in *Beta vulgaris* and the Monitoring of an Isolation Procedure for Micro-Nuclei and Micro-Protoplasts by Confocal Laser Scanning Microscopy and Flow Cytometry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 90 (2): 169-179.

- Ferenczy L, Kevei F, Szegedi M, Franko A, Rojik I. 1976. Factors Affecting High-Frequency Fungal Protoplast Fusion. *Experientia* 32 (9):1156–1158.
- Fish NW. 1988. Somatic hybridisation of potato (*Solanum tuberosum* L.). PhD-Thesis. University of London, UK.
- Frearson EM, Power JB, Cocking EC. 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Developmental Biology* 33:1130–1137.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soyabean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gavrilenko T, Thieme R, Tiemann H. 1999. Assessment of genetic and phenotypic variation among intraspecific somatic hybrids of potato, *Solanum tuberosum* L. *Plant Breeding* 118: 205-215.
- Geerts P, Druart P, Ochatt S, Baudoin J-P. 2008. Protoplast fusion technology for somatic hybridisation in *Phaseolus*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 12 (1):41-46.
- Glimelius K, Wallin A, Eriksson T. 1978. Concanavalin A improves the polyethylene method for fusing plant protoplasts. *Physiologia Plantarum* 44: 92-96.
- Glimelius K. 1985. Sexual and somatic hybridization. *Hereditas* 103(s3): 41-47.

- Grosser JW, Gmitter FG Jr. 2005. Applications of somatic hybridization and cybridization in crop improvement, with citrus as a model. *In Vitro Cell Development Biology-Plant* 41: 220–225
- Grosser JW, Gmitter FG. 2011. Protoplast fusion for production of tetraploids and triploids: applications for scion and rootstock breeding in citrus. *Plant Cell Tissue and Organ. Culture* 104: 343–357.
- Groth DI, Jacobs HE, Kunkel W, Berg H. 1987. Electrofusion of *Penicillium* protoplast after dielectrophoresis. *Journal of Basic Microbiology* 27: 341–344.
- Grzebelus E, Szklarczyk M, Baranski R. 2012. An improved protocol for plant regeneration from leaf and hypocotyl-derived protoplasts of carrot. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 109:101–109.
- Guo JB, Schieder O. 1983. Callus and root formation from mesophyll protoplasts of chinese cabbage (*Brassica chinensis* L.). *Zeitschrift Pflanzenphysiol* 110: 375–377.
- Guo JJ, Morrellfalvey JL, Labbé JL, Muchero W, Kalluri UC, Tuskan GA, Chen JG. 2012. Highly efficient isolation of populus mesophyll protoplasts and its application in transient expression assays. *PLoS ONE* 7:e44908.
- Hall R, Krens F, Rouwendal G. 1992. DNA radiation-damage and asymmetric somatic hybridization—is Uv a potential substitute or supplement to ionizing-radiation in fusion experiments. *Physiology Plantarum* 85:319–324

- Hansen LN. 1998. Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* L. and *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Euphytica* 104: 173–179.
- Hopwood DA, Wright HM. 1978. Factors Affecting Recombinant Frequency in Protoplast Fusions of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology* 111: 137-143.
- Hu Q, Hansen L, Laursen J, Dixelius C, Andersen S. 2002. Intergeneric Hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* Containing Traits of Agronomic Importance for Oilseed Rape Breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 105 (6-7): 834-840.
- Hu Q, Andersen SB, Hansen LN. 1999. Plant regeneration capacity of mesophyll protoplasts from *Brassica napus* and related species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 59(3): 189-196.
- Huang HY, Wang ZY, Cheng JT, Zhao WC, Li X, Wang HY, Zhang ZX, Sui XL. 2013. An efficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) protoplast isolation and transient expression system. *Scientia Horticulturae* 50: 206–212.
- Husni A. 2010. Fusi Protoplas Interspecies Antara Jeruk Siam Simadu (*Citrus nobilis* Lour.) dengan Mandarin Satsuma (*C. unshiu* Marc.). Disertasi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ishikawa S, Bang SW, Kaneko Y, Matsuzawa Y, Röbbelen G. 2003. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Breeding* 122(3): 233-238.



- Iwata M, Mada M, Ishiwa H. 1986. Protoplast fusion of *Lactobacillus fermentum*. Applied and Environmental Microbiology 52: 392-393.
- Jain SM, Newton RJ. 1988 Proto-Variation in Protoplast Derived *Brassica Napus* Plants. In: Progress in Plant Protoplast Research. Eds. K.J. Puite, J.J.M. Dons, H.J. Huizing, A.J. Kool. M. Koornneef, F.A. Krens. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, vol 7. Springer, Dordrecht
- Jaiswal SK, Hammatt, N, Bhojwani SS, Cocking EC, Davey MR. 1990. Plant regeneration from cotyledon protoplasts of *Brassica carinata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22(3): 159-165.
- Janderova B, Cvrckova F, Bendova O. 1990. Construction of the dextrin-degrading pof brewing yeast by protoplast fusion. Journal of Basic Microbiology 30 (7): 499-505.
- Javadekar VS, Sivavaman H, Gokhle DV. 1995. Industrial yeast improvement: Construction of a highly flocculant yeast with a killer character by protoplast fusion. Journal of Industrial Microbiology 15: 94-102.
- Jiang JJ, Jourdan ES, Earle ED Mutschler MA. 1990. Improved protoplast culture and stability of cytoplasmic traits in plants regenerated from leaf protoplasts of cauliflower (*Brassica oleracea* ssp. botrytis). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 21: 227-236.
- Jogdand SN. 2001. Protoplast Technology, Gene Biotechnology 3rd Ed. Himalaya Publishing house, Mumbai. India

- Jourdan PS, Earle ED. 1989. Genotypic variability in the frequency of plant regeneration from leaf protoplasts of four Brassica spp. and of *Raphanus sativus*. Journal of the American Society for Horticultural Science (USA) 5: 221-229.
- Kao KN, Salem M. 1986. Improved fusion of mesophyll and cotyledon protoplasts with polyethylene glycol and high pH-calcium solutions. Journal Plant Physiology 122: 217-223.
- Kato A, Vega JM, Han F, Lamb JC, Birchler JA. 2005. Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. Current Opinion in Plant Biology 8:148-154.
- Keller WA, Melchers G. 1973. The Effect of High pH and Calcium on Tobacco Leaf Protoplast Fusion. Zeitschrift für Naturforschung 28 c: 737 - 741.
- Kiełkowska A, Adamus A. 201. An alginate-layer technique for culture of *Brassica oleracea* L. protoplasts. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 48(2): 265-273.
- Kim GH, Klotchkova TA, Kang Y-M. 2001. Life without a cell membrane: regeneration of protoplasts from disintegrated cells of the marine green alga *Bryopsis plumose*. Journal of Cell Science 114: 2009-2014.
- Klimaszewska K, Keller WA. 1986. Somatic embryogenesis in cell suspension and protoplast cultures of *Brassica nigra* (L.) Koch. Journal Plant Physiology 122: 251-260.
- Kohler J, Darland G. 1988. Protoplast fusion in *Streptomyces avermitillis*. Journal of Industrial Microbiology 3 (5): 311-320.

- Kuzminsky E, Meschini R, Terzoli S, Pavani L, Silvestri C, Choury Z, Scarascia-Mugnozza G. 2016. Isolation of Mesophyll Protoplasts from Mediterranean Woody Plants for the Study of DNA Integrity under Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science* 7: 1168 doi.org/10.3389/fpls.2016.01168
- Lakshmanan P, Eeckhaut T, Van Huylenbroeck J, Van Bockstaele E. 2013. Micronucleation by Mitosis Inhibitors in Developing Microspores of *Spathiphyllum wallisii* Regel. *Plant Cell Reports* 32 (3): 369- 377.
- Lian YJ, Lin GZ, Zhao XM, Lim HT. 2012. Protoplast isolation and culture for somatic hybridisation of rapid cycling *Brassica rapa* with Anand'CMS and *Brassica juncea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 109(3): 565-572.
- Lillo C, Olsen JE. 1989. Growth and shoot formation in protoplast-derived calli of *Brassica oleracea* spp. A cephalia and spp. Capitata. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 17: 91–100.
- Liu WH, Chow LW, Lo CK. 1996. Strain improvement of *Arthroductor simplex* by protoplast fusion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 16: 257-260.
- Liu F, Ryschka U, Marthe F, Klocke E, Schumann G, Zhao H. 2007. Culture and fusion of pollen protoplasts of *Brassica oleracea* L. var. italica with haploid mesophyll protoplasts of *B. rapa* L. ssp. Pekinensis. *Protoplasma* DOI 10.1007/s00709-006-0228-5
- Liu S, Li F, Kong L, Sun Y, Qin L, Chen S, Cui H, Huang Y, Xia G. 2015. Genetic and Epigenetic Changes in Somatic Hybrid Introgression Lines Between Wheat and Tall Wheatgrass. *Genetics* 199(4): 1035–1045.

- Locatelli F, Vannini C, Magnani E, Coraggio I, Bracale M. 2003. Efficiency of transient transformation in tobacco protoplasts is independent of plasmid amount. *Plant Cell Report* 21: 865–871.
- Loudon PT, Nelson RS, Ingram DS. 1989. Studies of protoplast culture and plant regeneration from commercial and rapid cycling Brassica species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 213-224.
- Magae Y, Kashwagi Y, Senda M, Sasaki T. 1986. Electrofusion of gaint protoplast of *Pleurotus cornucopiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 24: 509-511.
- Maheshwari SC, Gill R, Maheshwari N, Gharyal PK. 1986. Isolation and regeneration of protoplasts from higher plants. In: *Differentiation of Protoplasts and of Transformed Plant Cells*. Eds. J. Reinert, H. Binding. Berlin, Springer-Verlag. Pp. 3–36.
- Malinowski R, Filipecki M. 2002. The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 1137–1151.
- Menczel L, Wolfe K. 1984. High frequency of fusion induced in freely suspended protoplast mixtures by polyethylene glycol and dim ethylsulfoxide at high pH. *Plant cell Reports* 3 (5):196-198.
- Mishra T, Goyal AK, Bhattacharya M, Kar P, Sen A. 2015. Polyethylene glycol mediated protoplast fusion of medicinally important *Canna*. *Research in Plant Biology* 5(1): 20-24.

- Muir WH, Hildebrandt AC, Riker AJ. 1954. Plant tissue cultures produced from single isolated cells. *Science* 119: 877-878
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.
- Murlidhar RV, Panda T. 2000. Fungal protoplast fusion: A revisit. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 22: 429-431.
- Narayanswamy S. 1994. Plant cells and tissue cultures. Plant Protoplast: Isolation, Culture and Fusion. TATA MCGraw Hill Publishing Company, New Delhi, India. P 391-469.
- Navrátilová B. 2004. Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae-a review. *Horticultural Science* 31(4): 140-157.
- Nazari R, Akbarzadeh A, Norouzian D, Farahmand B, Vaez J, Sadegi A, Hormozi F, Rad KM, ZarbakshB. 2005. Applying intraspecific protoplast fusion in *Streptomyces griesoflavus* to increase the production of Desferrioxamines B. *Current Science* 88 (11): 1815-1820.
- Nea LJ, Bates GW. 1987. Factors affecting protoplast electrofusion efficiency. *Plant Cell Reports* 6(5): 337-340
- Negrutiu I, Mouras A, Gleba Y, Sidorov V, Hinnisdaels S, Famelaer Y, Jacobs M. 1989 Symmetric Versus Asymmetric Fusion Combinations in Higher Plants. In: Plant Protoplasts and Genetic Engineering I. Ed. Y.P.S Bajaj. Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol 8. Springer, Berlin, Heidelberg

- Nurhasanah. 2011. Deteksi Dini Ploidy Tanaman Menggunakan Flow Cytometry Dalam Perakitan Tanaman Doubled Haploid Pada Tanaman Rapeseed (*Brassica Napus* L). *Bioprospek* 8 (11): 55-62
- Ochatt JS. 2008. Flow Cytometry in Plant Breeding. *International Society Advancement of Cytometry* 73(7): 581-598.
- Palzerová H, Patzak J, Greplová M. 2011. Early characterization of somatic hybrids from symmetric protoplast electrofusion of *Solanum pinnatisectum* Dun. And *Solanum tuberosum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104:163–170
- Parihar DS, Maheshwari SC, Khurana P. 1995. High frequency somatic embryogenesis and plantlet regeneration from hypocotyl protoplast cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* 42: 113–115.
- Pasha C, Kuhad RC, Rao CV. 2007. Strain improvement of thermo tolerant *Saccharomyces cerevesie* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1480-1489.
- Patel M, Dewey RE, Qu R. 2013. Enhancing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency of perennial ryegrass and rice using heat and high maltose treatments during bacterial infection. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 114:19–29.
- Pauls KP, Chuong PV. 1987. Flow cytometric identification of *Brassica napus* protoplast fusion products. *Canadian Journal Botany* 65: 834–838.

- Power JB, Berry SE, Chapman JV, Cocking EC. 1980. Somatic hybridization of sexually incompatible petunias: *Petunia parodii*, *Petunia parviflora*. *Theoretical and Applied Genetics* 57(1): 1-4.
- Power JB, Cummings SE, Cocking E C. 1970. Fusion of isolated plant protoplasts. *Nature* 225: 1016-1018.
- Prabavathy VR, Mathiavanan N, Sagadevan E, Murugesan K, Lalithakumari D. 2006. Intra strain protoplast fusion enhances carboxymethylcellulase activity in *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 719-723.
- Prakash S, Hinata K. 1980. Taxonomy, cytogenetics and origin of crop Brassicas, a review. *Opera Botanica* 55:1-57
- Puite KJ. 1992. Progress in plant protoplast research. *Physiologia Plantarum* 85: 403-410.
- Purwito A. 1999. Fusi protoplas intra dan interspecies pada tanaman kentang. Disertasi Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rubinder K, Chadha BS, Singh S, Saini HS. 2000. Amylase hyperproducing haploid recombinant strains of *Thermomyces lanuginosus* obtained by intraspecific protoplast fusion. *Canadian Journal of Microbiology* 46: 669-673.
- Sarkar D, Tiwari J, Sharma S, Sharma Poonam S, Gopal J, Singh B, Luthra S, Pandey S, Pattanayak D. 2011. Production and characterization of somatic hybrids between *Solanum tuberosum* L. and *S. pinnatisectum* Dun. *Plant Cell Tiss Org* 107:427-440

- Schenk RU, Hildebrandt AC. 1969. Production of Protoplasts from Plant Cells in Liquid Culture Using Purified Commercial Cellulases *Crop Science* 9: 629-631
- Scholze P, Krämer R, Ryschka U, Klock E, Schuman G. 2010. Somatic hybrids of vegetable Brassicas as source for new resistances to fungal and virus diseases. *Euphytica* 176(1): 1-1.
- Seon JH, Chung JD, Chun CK. 1985. Factors affecting protoplast fusion of *Petunia hybrida* Kyongbuk National Univ., Taegu (Korea R.). Dept. of Horticulture, Korea.
- Shankar LP, Eeckhaut T, Dieter D, Van Bockstaele E, Van Huylenbroeck J. 2013. Asymmetric Somatic Plant Hybridization: Status and Applications. *American Journal of Plant Sciences* 4: 1-10.
- Shi Y Z, Chen Q, Li HY, Beasley D, Lynch DR. 2005. Somatic hybridization between *Solanum tuberosum* and *S. cardiophyllum*. *Canadian Journal of Plant Science* 85: 539-545.
- Sihachakr D, Haicour R, Serraf I, Barrientos E, Herbreteau C, Ducreux G, Rossignol L, Souvannavong V. 1988. Electrofusion for the production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. Clark. *Plant Science* 57:215–223.
- Srinivas R, Panda T. 1997. Localization of carboxymethyl cellulase in the intergeneric fusants of *Trichoderma reesei* QM 9414 and *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3288. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 18: 71-73.



- Sunberg L, Glimelius K. 1991. Production of cybrid plants within Brassicaceae by fusing protoplasts and plasmotically induced cytoplasts. *Plant Science* 79: 205–216.
- Sundberg E, Glimelius K. 1986. A method for production of interspecific hybrids within Brassicaceae via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Science* 43: 155-162.
- Sundberg E, Landgren M, Glimelius K. 1987. Fertility and chromosome stability in *Brassica napus* resynthesised by protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics* 75(1): 96-104.
- Tan BY, Xu M, Chen Y, Huang MR. 2013. Transient expression for functional gene analysis using *Populus* protoplasts. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114:1–8.
- Terada R, Yamashita Y, Nishibayashi S, Shimamoto K. 1987. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. *Theoretical and Applied Genetics* 73(3): 379-384.
- Thieme R, Darsow U, Gavrilenko T, Dorokhov D, Tiemann H. 1997. Production of somatic hybrids between *S. tuberosum* L. and late blight resistant Mexican wild potato species. *Euphytica* 97: 189200.
- Tomiczak K, Miku A, Sliwinska E, Rybczyński JJ. 2015. Autotetraploid plant regeneration by indirect somatic embryogenesis from leaf mesophyll protoplasts of diploid *Gentiana decumbens* L.f. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* DOI 10.1007/s11627-015-9674-0

- Tylicki A, Burza W, Malepszy S, Kuraś M. 2001. Regeneration of the cell wall by isolated protoplasts of *Solanum lycopersicoides* Dun. is a selective process. *Biological Bulletin of Poznań* 38: 97–101.
- Uddin JM. 2014. Protoplast isolation and fusion between *Brassica rapa* & *Brassica juncea*. Thesis, Department of Genetics and Plant Breeding Bangladesh Agricultural University, Mymensingh.
- Ulrich TH, Chowdhury JB, Widholm JM. 1980. Callus and root formation from mesophyll protoplasts of *Brassica rapa*. *Plant Science Letters* 19: 347-354.
- Urano N, Higha SR, Hirai H. 1998. Effect of mitochondria on electrofusion of yeast protoplast. *Enzyme and Microbial Technology* 23:107-112
- Ushijima S, Nakadai T, Uchida K. 1991. Interspecific electrofusion of protoplasts between *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus sojae*. *Agricultural and Biological Chemistry* 55:129-136.
- Varotto S, Nenz E, Lucchin M, Parrini P. 2001. Production of Asymmetric Somatic Hybrid Plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. *Theoretical and Applied Genetics* 102 (6-7): 950-956.
- Veilleux RE, Compton ME, Saunders JA. 2005. Use of Protoplasts for Plant Improvement. In: *Plant Development and Biotechnology*, Trigiano RN and Gray DJ (Eds.). CRC Press, Florida, pp: 213.

- Waara S, Tegelström H, Walfin A, Eriksson T. 1989. Somatic hybridization between anther-derived dihaploid clones of potato (*Solanum tuberosum* L.) and the identification of hybrid plants by isozyme analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 77: 49-56.
- Walters TW, Mutschler MA, Earle D. 1992. Protoplast fusion-derived Ogura male sterile cauliflower with cold tolerance. *Plant Cell Reports* 10: 624–628.
- Wang GX, Tang Y, Yan H, Sheng XG, Hao W, Zhang L, Liu F. 2011. Production and characterization of interspecific somatic hybrids between *Brassica oleracea* var. botrytis and *B. nigra* and their progenies for the selection of advanced pre-breeding materials. *Plant Cell Reports* 30(10): 1811-1821.
- Wang YP, Sonntag K, Rudloff E, Groeneveld I, Gramenz J, Chu CC. 2006. Production and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86(2): 279-283.
- Wenzel G. 1973. Isolation of leaf protoplasts from haploid plants of petunia, rape and rye. *Zeitschrift Pflanzenzücht* 69: 58-61.
- Willison JHM, Cocking EC. 1975. Micro fibril synthesis at the surface of isolated tobacco mesophyll protoplasts a freeze-etch study. *Protoplasma* 84: 147–159.
- Wiszniewska A, Piwowarczyk B. 2014. Studies on Cell Wall Regeneration in Protoplast Culture of Legumes – the Effect of Organic Medium Additives on Cell Wall Components *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 50 (2): 84–91

- Witjaksono, Litz RE, Grosser JW. 1998. Isolation, culture and regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.) protoplasts. *Plant Cell Rep* 18:235–242.
- Withers LA, Cocking EC. 1972. Fine structural studies on spontaneous and induced fusion of higher plant protoplasts. *Journal Cell Science* 11: 59-75.
- Wu F, Shen S, Lee L, Lee S, Chan M, Lin C. 2009. Tape-Arabidopsis sandwich-a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Method* 5:16
- Xu X, Lu J, Dalling D, Jittayasothorn Y, Grosser JW. 2007. Isolation and culture of grape protoplasts from embryogenic suspension cultures and leaves of *Vitis vinifera* and *Vitis rotundifolia*. *Acta Horticultura* 738:787–790.
- Xu ZH, Davey MR, Cocking EC. 1982. Plant regeneration from root protoplasts of Brassica. *Plant Science Letter* 24: 117-121.
- Yamagishi H, Langren M, Forsberg J, Glimelius K. 2002. Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 959–964.
- Yari S, Inanlou DN, Yari F, Salech M, Farahound B, Akbarzadeh A. 2002. Effects of protoplast fusion on  $\delta$ -endotoxin production in *Bacillus thuringiensis* spp CH 141. *Iranian Biomedical Journal* 6: 25-29.
- Yoo SD, Cho YH, Sheen J. 2007. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols* 2: 1565–1572.

- Yu CC, Wang LL, Chen C, He CL, Hu J, Zhu YG, Huang WC. 2014. Protoplast: a more efficient system to study nucleocytoplasmic interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450: 1575–1580.
- Yu G, Cheng Q, Xie Z, XU B, Huang B, Zhao B. 2017. An efficient protocol for perennial ryegrass mesophyll protoplast isolation and transformation, and its application on interaction study between LpNOL and LpNYC1. *Plant Methods* 13:46 DOI 10.1186/s13007-017-0196-0
- Yu Y, Ye W, He L, Cai X, Liu T, Liu J. 2013. Introgression of bacterial wilt resistance from eggplant to potato via protoplast fusion and genome components of the hybrids. *Plant Cell Reports* 32:1687–1701
- Zachrisson A, Borrmann CH. 1984. Application of electric field fusion in plant tissue culture. *Physiologia Plantarum* 61: 314-320.
- Zachrisson A, Borrmann CH. 1986. Electro manipulation of plant protoplasts. *Physiologia Plantarum* 67: 507-516.
- Zhang Q, Liu J, Deng X. 2006. Isolation of Microprotoplasts from a Partially Synchronized Suspension Culture of Citrus unshiu. *Journal of Plant Physiology* 163 (11): 1185-1192.
- Zhang WJ, Dewey RE, Boss W, Phillippy BQ, Qu R. 2013. Enhanced Agrobacterium-mediated transformation efficiencies in monocot cells is associated with attenuated defense responses. *Plant Molecular Biology* 81:273-286.

- Zhang ZB, Burgos NR, Zhang JP, YU LO. 2007. Biological control agent for rice weeds from protoplast fusion between *Curvularia lunata* and *Helminthosporium gramineum*. *Weed Science* 55: 599-605.
- Zhou A, Xia G, Chen H, Hu H. 2001. Comparative study of symmetric and asymmetric somatic hybridization between common wheat and *Haynaldia villosa*. *Science China Life Sciences* 44(3): 294-304.
- Zhao K, Zhou D, Ping W, Ge J. 2004. Study on the preparation and regeneration of protoplast from Taxol-Producing fungus *Nodulisporium sylviformis*. *Natural Science* 2: 52-59. Method for producing novel lectan antibiotic from protoplast fusion strain. United states Patent 7241588.
- Zhao ZG, Hu TT, Ge XH, Du XZ, Ding L, Li ZY. 2008. Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* and their backcrossing progenies. *Plant Cell Report* 27: 1611-1621.
- Zimmermann U. 1983. Electrofusion of cells: principles and industrial potential. *Trends in Biotechnology* 1(5): 149-155.



# RIWAYAT HIDUP

---

Dr.sc.agr. Nurhasanah, SP., MSi. Lahir di Jambi pada 27 Oktober 1975 anak dari pasangan Baharuddin dan Sri Salmiah. Menyelesaikan pendidikan dasar dan menengah di SDN 59/IV Jambi, SMPN 6 Jambi, dan SMAN 3 Jambi. Penulis menyelesaikan pendidikan tinggi lanjutan Program Sarjana di Universitas Jambi, Program Master di Intitut pertanian Bogor, dan Program Doktor di Ge-



org-August University of Goettingen Germany. Penulis merupakan dosen di Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman, Samarinda-Kalimantan Timur. Bidang keahlian penulis adalah *molecular breeding*. Sejak tahun 2013 penulis aktif melakukan penelitian terutama terkait dengan karakterisasi dan pengembangan plasma nuftah padi lokal, baik melalui teknik konvensional maupun non-konvensional (*Biotechnological approach*). Penulis aktif menulis baik pada jurnal nasional dan internasional, buku dan melakukan *inventory* yang beberapa diantaranya telah dipatenkan. Penulis juga merupakan *reviewer* pada beberapa jurnal internasional bereputasi.





Widi Sunaryo, SP, MSi., PhD. Lahir di Blitar Jawa Timur pada 2 April 1973. Penulis adalah anak kedua dari lima bersaudara. Menyelesaikan pendidikan SD hingga SMA di SDN Sawentar I, SMPN Kanigoro I, dan SMAN Talun Blitar. Pendidikan Sarjana di peroleh dari Fakultas Pertanian Universitas Mulawarman bidang studi Agronomi dan melanjutkan Program Master di Intitut pertanian Bogor untuk bidang studi Bi-

oteknologi. Pada tahun 2010 berhasil menyelesaikan program doktor di Georg-August Universitaet Goettingen untuk bidang Bioteknologi Tanaman. Sejak tahun 1999 penulis telah diangkat menjadi dosen dan peneliti di Fakultas Pertanian, Universitas Mulawarman dan aktif melakukan penelitian dan menulis karya ilmiah. Penulis aktif meneliti dan mendapatkan hibah penelitian berskala Nasional terutama dari Kemendikbud dan Kemenristek. Sampai saat ini penulis telah menghasilkan banyak tulisan di jurnal internasional, jurnal nasional, prosiding, buku referensi berbahasa inggris, karya HAKI berupa paten dan pendaftaran varietas. Selain sebagai dosen dan peneliti, saat ini penulis menjabat sebagai Kepala UPT. Layanan Internasional, Universitas Mulawarman sejak tahun 2017.