



Pemuliaan Tanaman Melalui Fusi Protoplas

Plant Breeding Through Protoplast Fusion

Devi Armita ^{1)*}

1. Biologi, Fakultas Sains & Teknologi Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

SUBMISSION TRACK

Submitted : 2020-12-07
 Revised : 2020-12-27
 Accepted : 2021-01-02
 Published : 2021-01-04

KEYWORDS

protoplast fusion,
protoplast regeneration,
plant breeding

*)CORRESPONDENCE

email:
devi.armita@uin-alauddin.ac.id

ABSTRACT

Protoplast culture (protoplast fusion) is one method of tissue culture that is widely used in plant breeding programs in a relatively short time. This method is used to overcome the problem of plants that are difficult or impossible to cross conventionally as well as used for species improvement by transferring the desired gene from the donor plant to the target plant via protoplast fusion. Protoplast fusion makes it possible to produce plants that are resistant to a disease and various abiotic stresses, rapid growth rates and have a better quantity and quality of metabolites than their parents. Various factors affect the success of fusion and regeneration of protoplasts into whole plants, including the source of explants, the composition of the enzyme solution and the duration of incubation, fusagen type and culture media for regeneration.

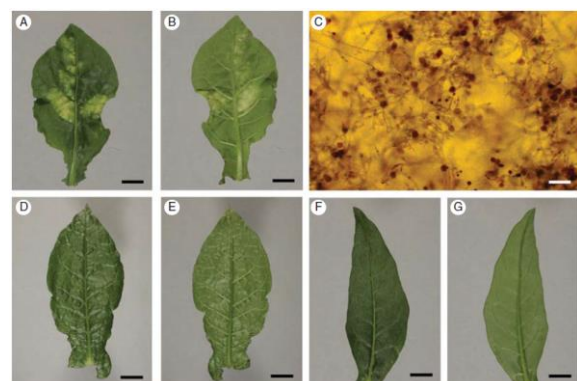
PENDAHULUAN

Kultur protoplas atau dikenal juga dengan istilah hibridisasi somatik merupakan suatu metode kultur jaringan yang berperan dalam meningkatkan keragaman genetik tanaman dengan menggabungkan materi genetik dua spesies tanaman yang berbeda untuk membuat suatu tanaman hibrida (Nurhasanah and Sunaryo, 2019). Spesies liar (*wild type*) memiliki banyak gen yang bermanfaat maupun tidak bermanfaat pada tanaman budidaya. Transfer gen yang bermanfaat dari spesies liar banyak dilakukan untuk menghasilkan tanaman berkualitas namun transfer gen dari spesies liar melalui hibridisasi seksual banyak mengalami kegagalan sehingga salah satu solusi yang digunakan adalah hibridisasi somatik melalui fusi protoplas.

Hibridisasi somatik akan menghasilkan tanaman yang berkualitas baik dan memiliki ketahanan terhadap stress biotik maupun abiotik (Jia *et al.*, 2017). Namun tingkat keberhasilan fusi protoplas dapat bersifat random, sebagaimana yang dilaporkan pada penelitian yang dilakukan oleh (Putra *et al.*, 2013) pada tanaman hasil fusi protoplas jeruk Satsuma Mandarin dan jeruk Siam madu terhadap infeksi

penyakit kulit diplodia (*Botryodiplodia theobromae* Pat.). Tanaman hasil fusi protoplas dari dua tetua tersebut memiliki variabilitas genetik yang tinggi dalam hal tingkat ketahanan terhadap infeksi penyakit, mulai dari kategori rentan hingga resisten terhadap infeksi.

Resistensi terhadap infeksi penyakit juga diperlihatkan pada tanaman hasil fusi protoplas antara tanaman *Nicotiana x sanderae* dan *N. debneyi* terhadap serangan fungi *Peronospora tabacina* dibandingkan tanaman induknya yaitu *Nicotiana x sanderae* sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Perbandingan antara kondisi daun (A) permukaan atas dan bawah (B) tanaman *Nicotiana x sanderae* yang diinfeksi dengan

fungi *Peronospora tabacina* (C); daun permukaan atas (D) dan permukaan bawah (E) tanaman *N. debneyi*; serta daun permukaan atas (F) dan bawah (G) tanaman hasil fusi protoplas antara *Nicotiana x sanderae* dan *N. debneyi* (Patel *et al.*, 2011).

Resistensi juga ditunjukkan oleh tanaman hasil fusi protoplas antara tanaman *Populus tremula* L. dan *P. tremuloides* Michx terhadap stres abiotik, dalam hal ini stres kekeringan. Tanaman hasil fusi protoplas (tetraploid) memiliki karakteristik morfologis yang bervariasi secara signifikan seperti tinggi tanaman, luas total daun dan karakteristik stomata serta karakter fisiologi seperti produksi karbohidrat. Berdasarkan karakter morfologi dan fisiologi yang diamati pada tanaman hasil fusi protoplas semuanya mengalami peningkatan kandungan karbohidrat dan penurunan karakter morfologi yang lebih rendah dibanding tanaman yang bukan hasil fusi protoplas (diploid) sehingga dapat dikatakan bahwa tanaman hasil fusi protoplas lebih toleran terhadap kondisi stres kekeringan (Hennig *et al.*, 2015).

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan untuk penulisan artikel ini yaitu melalui studi literatur secara *online*. Studi literatur dilakukan dengan mencari dan mengunduh artikel yang sesuai dengan tema yang dikaji melalui Google Scholar, Research Gate dan Elsevier (Scopus). Dilakukan kajian terhadap artikel-artikel yang telah dikumpulkan tersebut sesuai dengan kajian yang akan dibahas pada artikel yang ditulis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan kultur protoplas dipengaruhi oleh sumber eksplan, komposisi larutan enzim, waktu inkubasi (Chabane *et al.*, 2007), jenis fusagen yang digunakan (Wijanarka *et al.*, 2014) serta jenis media kultur yang digunakan untuk regenerasi protoplas melalui organogenesis ataupun embriogenesis dengan atau tanpa melalui pembentukan kalus.

1. Sumber eksplan

Pemilihan jaringan yang akan digunakan sebagai sumber eksplan merupakan salah satu tahapan krusial dalam melakukan proses kultur. Jaringan yang digunakan sebagai sumber eksplan dipengaruhi pula oleh jenis tanaman. Pada tanaman dari famili *Gentiana*, keberhasilan regenerasi tanaman dari protoplas telah dilaporkan dengan menggunakan protoplas dari sel mesofil daun, kalus dan suspensi sel (Shi, Yang and He, 2016). Hal yang sama juga dilaporkan pada beberapa tanaman *Cucumis* spp. seperti *C. melo*, *C. metuliferus* dan *C. sativus* memiliki viabilitas protoplas lebih dari 50% yang berasal dari berbagai sumber eksplan yang berbeda yaitu daun, pucuk, hipokotil dan kalus (Gajdová *et al.*, 2007).

Pada spesies tanaman monokotil, sumber eksplan yang paling baik adalah suspensi sel embriogenik untuk tanaman sereal dan padi ataupun menggunakan kalus embriogenik pada tanaman pisang (Chabane *et al.*, 2007). Pada tanaman berdaun keras seperti tanaman oak (*Quercus ilex* L.), proses preparasi sumber eksplan lebih kompleks karena adanya sklerenkim dan sel-sel yang mengeras (Kuzminsky *et al.*, 2016).

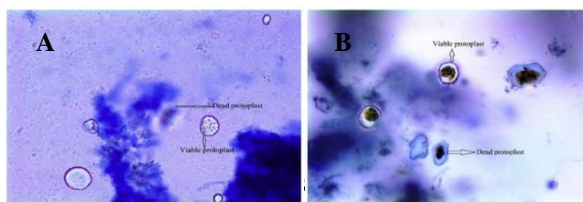
2. Komposisi larutan enzim dan durasi inkubasi

Enzim pada kultur protoplas digunakan untuk melisiskan dinding sel pada tahapan isolasi protoplas. Dinding sel yang masih muda tersusun dari pektin dan selulosa sehingga untuk melisiskan komponen penyusun dinding sel digunakan *pectinase* (untuk melisiskan pektin) dan *cellulose* (untuk melisiskan selulosa) (Riyadi, 2006).

Konsentrasi dan kombinasi enzim yang digunakan memiliki pengaruh yang signifikan terhadap keberhasilan isolasi protoplas dari sumber eksplan (Kumar, Sandeep and Rao, 2018; Tang *et al.*, 2019). Larutan yang digunakan untuk isolasi protoplas mengandung gula untuk melindungi kerusakan membran plasma (Tomar and Dantu, 2010). Jenis gula yang sering digunakan adalah manitol (Chabane *et al.*, 2007; Kumar, Sandeep and Rao, 2018; Tang *et al.*,

2019; Wen *et al.*, 2020). Manitol banyak digunakan sebagai *stabilizer osmotik* atau *osmolyticum* dibanding gula jenis lainnya seperti sorbitol karena gula ini tidak dimetabolisme oleh tanaman sehingga lebih stabil dalam menjaga kondisi osmotik sel dan mencegah kerusakan protoplas yang telah dihilangkan dinding selnya (Nurhasanah and Sunaryo, 2019). Waktu atau lama perendaman sumber eksplan dalam larutan enzim juga berpengaruh terhadap jumlah dan viabilitas protoplas. Lama perendaman tergantung spesies dan sumber eksplan yang digunakan. Beberapa jenis kombinasi larutan enzim, waktu dan suhu inkubasi yang digunakan untuk isolasi protoplas dapat dilihat pada Tabel 1.

Konsentrasi dan kombinasi larutan enzim yang digunakan akan memengaruhi viabilitas protoplas. Perbandingan antara protoplas yang viabel dan mati ditunjukkan pada Gambar 2.



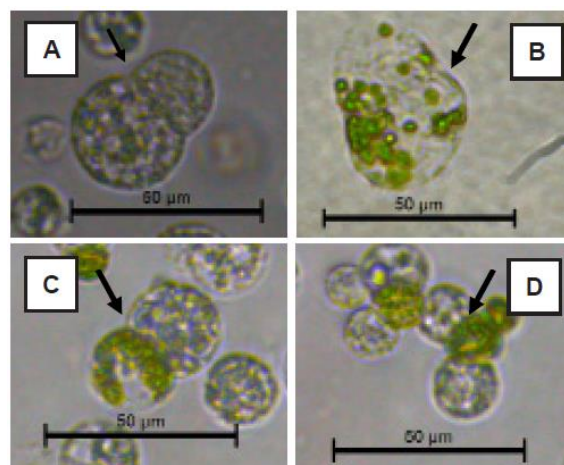
Gambar 2. Perbandingan protoplas viabel dan mati pada tanaman *Oryza sativa* (A) dan *Myriostachya wightiana* (B) dengan perbesaran 100x (Kumar, Sandeep and Rao, 2018).

3. Jenis fusagen

Fusi (peleburan) protoplas dapat dilakukan dengan menggunakan arus listrik (elektrofusi), menggunakan mikro manipulator (fusi mekanik) ataupun menggunakan fusagen yaitu bahan kimia yang digunakan untuk memacu peleburan protoplas (Nurhasanah and Sunaryo, 2019). Fusi protoplas terbagi atas homofusi yaitu fusi antara

dua protoplas yang sama misalnya antara protoplas daun atau antara protoplas kalus, heterofusi yaitu fusi antara dua protoplas yang berbeda, misalnya antara protoplas daun dan kalus serta multifusi yaitu fusi antara lebih dari dua fusi yang sama ataupun berbeda. Beberapa tipe fusi protoplas ditunjukkan pada Gambar 3.

Peleburan dengan menggunakan fusagen merupakan metode fusi yang paling sering digunakan. Jenis fusagen yang digunakan antara lain PEG 6000 dengan konsentrasi 30 % dan 35% (Wijanarka *et al.*, 2014). Pada proses fusi protoplas antara *M. wightiana* and *O. sativa* dengan ratio 1:1 (v/v) digunakan campuran antara PEG dengan konsentrasi 50%, 0.5 mM CaCl_2 dan 0.5M manitol sebagai fusagen dengan pH 7.5 (Kumar, Sandeep and Rao, 2018).



Gambar 3. Tipe fusi protoplas: (A) homofusi antara protoplas kalus jeruk keprok Garut; (B) homofusi antara protoplas daun jeruk nambangan; (C) heterofusi antara protoplas daun jeruk pummelo Nambangan dan kalus jeruk keprok Garut; serta (D) Multifusi antara beberapa protoplas daun pummel nambangan dan kalus jeruk keprok Garut yang diamati dengan perbesaran mikroskop 40x (Wulandari *et al.*, 2018).

Tabel 1. Larutan enzim untuk isolasi protoplas yang digunakan untuk berbagai tanaman dan sumber eksplan*

No	Larutan Enzim	Durasi	Suhu Inkubasi (°C)	Spesies Tanaman	Sumber Eksplan
1	0.5 M Manitol + 10 mM MES + 10 mM CaCl_2 + 0.1 BSA + Cellulase RS + Macerozyme R-10	80 menit	25	<i>Ricinus communis</i> L.	Daun
2	• 0.6 M Manitol + 3% Cellulase R-10 + 1%	• 24 jam (<i>M. wightiana</i>)	37	<i>Myriostachya wightiana</i>	Biji

	Pectinase + 1% Macerozyme • 0.6 M Manitol + 5% Cellulase R-10 + 2% Pectinase + 2% Macerozyme	• 12 jam (<i>O. sativa</i>)		& <i>Oryza sativa</i>	
3	Cellulase RS 1.5% + Pectolyase (0.15%; 0.2%) + Hemicellulase 0.2% + Pectinase (1%; 1.5%) + KCl 3% + CaCl ₂ 0.5%	12–20 jam	27	<i>Phoenix dactylifera</i> L.	Daun dan kalus
4	90 g/L Manitol (1/2 jam) → 130 g/L Manitol (1/2 jam) + 1.5% Cellulase + 0.5% Pectinase + 1.5% Macrozyme)	20 jam	25	<i>Malus domestica</i> 'Anna' cv.	Daun
5	0.25 % Cellulase of <i>Aspergillus niger</i> + 0.25 % 43cellulose of <i>Penicillium funiculosum</i> + 0.5 % cellulysin of <i>Trichoderma viridae</i> +	13 jam	24	<i>Vitis vinifera</i> L.	Daun
6	20 mM MES + 5 mM CaCl ₂ + 0.6 M Manitol + 1% Cellulase Onozuka R-10 + 0.1% Pectolyase Y-23	12 jam	24	<i>Daucus carota</i>	Daun dan hipokotil
7	1% Cellulase Onozuka R-10 + 0.25% Macerozyme dilarutkan menggunakan PGLy washing solution	16-17 jam	25	<i>Cucumis</i> spp.	Daun, apeks dan hipokotil
8	2% Cellulase Onozuka R-10 + 1% Macerozyme + 0.3% Driselase	17 jam	25	<i>Cucumis</i> spp.	Kalus
9	Manitol 13% + Cellulase (1%; 2%; 3%) + Pectolyase 0.1% + Macerozyme 0.5% + Driselase 0.5% + 5 mmol MES	3 jam	20-25	<i>O. sativa</i> dan <i>O. officinalis</i>	Kalus dan batang muda

* (Mliki *et al.*, 2003; Chabane *et al.*, 2007; Gajdová *et al.*, 2007; Sukmadjaja *et al.*, 2007; Grzebelus, Szklarczyk and Baranski, 2012; Kumar, Sandeep and Rao, 2018; El-Gioushy, Kareem and Baiea, 2019; Tang *et al.*, 2019)

4. Jenis dan komposisi media kultur

Komposisi media kultur yang digunakan memengaruhi keberhasilan regenerasi protoplas. Media yang digunakan adalah media basal yang disesuaikan dengan jenis tanaman. Sebagian besar tanaman menggunakan media Murashige & Skoog (MS) dengan beberapa modifikasi. Berdasarkan hasil evaluasi jenis media yang digunakan untuk regenerasi protoplas pada tanaman *M. domestica* 'Anna' cv diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa media MS memberikan hasil terbaik bagi perkembangan protoplas dibanding media KM dan B5 (Gambort) (El-Gioushy, Kareem and Baiea, 2019). Kultur hasil fusi protoplas *O. sativa* dan *M. wightiana* juga menggunakan media MS

dengan penambahan vitamin dan zat pengatur tumbuh yaitu BAP, NAA dan 2.4-D sedangkan pada tanaman *P. dactylifera* digunakan media MS dengan penambahan vitamin dan PEG 4000 (Chabane *et al.*, 2007; Kumar, Sandeep and Rao, 2018). Penggunaan media MS sebagai media kultur protoplas juga digunakan untuk tanaman *Manihot esculenta* Crantz dengan penambahan vitamin KM (Kao & Michayluk) dan ZPT jenis BAP dan IAA serta CuSO₄, sukrosa dan *Phytigel* 0.5% (media padat) (Fitriani *et al.*, 2019) sedangkan hasil fusi protoplas antara protoplas tanaman *N. x sanderae* dan *N. debneyi* menggunakan media MS cair (Patel *et al.*, 2011).

Media lain yang digunakan untuk regenerasi protoplas yaitu media N6 untuk tanaman *Iris*

fulva dengan variasi konsentrasi glukosa. Konsentrasi glukosa yang terbaik untuk menginduksi pembentukan koloni yaitu 0.3 M dan 0.5 M untuk menginduksi pembelahan sel (Inoue *et al.*, 2004). Pada tanaman *Daucus carota* L. regenerasi protoplas menggunakan media CPP yang terdiri dari nutrisi makro dan mikro, vitamin, glukosa dan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan zeatin (Grzebelus, Szklarczyk and Baranski, 2012). Pada tanaman *Cucumis* spp. penggunaan media LCM yang terdiri dari nutrisi makro dan mikro media B5, vitamin, glukosa, MES dan zat pengatur tumbuh NAA, 2,4-D serta BA lebih baik dalam mendukung keberhasilan regenerasi protoplas dibandingkan dengan media CML yang mengandung nutrisi makro dan mikro media MS, sukrosa dan zat pengatur tumbuh NAA dan IPA (Gajdová *et al.*, 2007).

KESIMPULAN

Fusi protoplas bisa menjadi salah satu solusi untuk menghasilkan tanaman unggul yang dapat mendukung program pemuliaan tanaman yang banyak digalakkan saat ini. Keberhasilan metode ini perlu mempertimbangan berbagai faktor krusial sehingga tingkat keberhasilan lebih tinggi dan bisa dihasilkan tanaman dengan kualitas unggul dan bermanfaat bagi petani ataupun masyarakat secara umum

DAFTAR PUSTAKA

- El-Gioushy, S.F.E.E., Abdul Kareem and Mohamed Hemdan Mohamed Baiea. 2019. Pre-isolation, Isolation and Regeneration Protoplasts from Leaf Mesophyll of In Vivo *Malus Domestica* “Anna” cv. Revista Brasileira de Fruticultura 41(4): 1–13.
- Gajdová, J., B. Navrátilová., J. Smolná and A. Lebeda. 2007. Factors Affecting Protoplast Isolation and Cultivation of *Cucumis* spp. Journal of Applied Botany and Food Quality 81: 1–6.
- Grzebelus, Ewa., Marek Szklarczyk and Rafal Baranski. 2012. An Improved Protocol for Plant Regeneration from Leaf- and Hypocotyl- Derived Protoplasts of Carrot. Plant Cell Tissue Organ Culture 109: 101–109.
- Hennig, Anne., Jorg R.G. Kleinschmit., Sebastian Schoneberg., Sonja Löffler., Alwin Janßen and Andrea Polle. 2015. Water Consumption and Biomass Production of Protoplast Fusion Lines of Poplar Hybrids Under Drought Stress. Frontiers in Plants Science 6: 1–14.
- Inoue, Kouichi., Tomomi Kato., Hisato Kunitake and Tsutomu Yabuya. 2004. Efficient Production of Polyploid Plants via Protoplast Culture of *Iris fulva*. Cytologia 69(3): 327–333.
- Inoue, Kouichi., Tomomi Kato, Hisato Kunitake and Tsutomu Yabuya. 2007. Induction of Callus Formation from Difficile Date Palm Protoplasts by Means of Nurse Culture’. Comptes Rendus Biologies 330(5): 392–401.
- Jia, Li-cong., Hong Zhai., Shao-zhen He., Yu Feng Yang and Qing-chang Liu. 2017. Analysis of Drought Tolerance and Genetic and Epigenetic Variations in A Somatic Hybrid between *Ipomoea batata* (L.) Lam. and *I. triloba* L. Journal of Integrative Agriculture 16(1): 36–46.
- Kumar, M. Kiran., B.V. Sandeep and P. Sudhakar Rao. 2018. Development of Salt Tolerant Callus Cultures by Somatic Hybridization Between *Oryza sativa* and Mangrove Grass *Myriostachya wightiana*. Annals of Agrarian Science 16(4): 396–404.
- Kuzminsky, Elena., Roberta Meschini., Serena Terzoli., Liliana Pavani., Cristian Silvestri., Zineb Choury and Giuseppe Scarascia-Mugnozza. 2016. Isolation of Mesophyll Protoplasts from Mediterranean Woody Plants for The Study of DNA Integrity Under Abiotic Stress. Frontiers in Plants Science 7: 1–7.
- Mliki, Ahmed., Rahma Jardak., Götz M. Reustle and Abdelwahed Ghorbel. 2003. Isolation and Culture of Leaf Protoplast from Tunisian Grapes. Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin 37(3): 145–153.
- Nurhasanah and Sunaryo, W. 2019. Fusi Protoplas. Cetakan I. Edited by P. Desriawan and D. Mu. Nastiti. IPB Press. Bogor.
- Patel, Deval., J Brian Power., Paul Anthony., Farah Badakshi., J S Pat Heslop-Harrison and Michael R Davey. 2011. Somatic Hybrid Plants of *Nicotiana x sanderae* (+) *N . debneyi* with Fungal Resistance to *Peronospora tabacina*. Annals of Botany 108(5): 809–819.
- Putra, Dharmawan., Liliek Sulisyowati., Abdul

- Cholil dan C Martasari. 2013. Evaluasi Ketahanan Tanaman Jeruk (*Citrus* sp.) Hasil Fusi Protoplas Jeruk Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu*) dan Jeruk Siam Madu (*Citrus nobilis*) terhadap Infeksi Penyakit Kulit Diplodia (*Botryodiplodia theobromae* Pat.). Jurnal Hama Penyakit Tanaman 1(1): 16–26.
- Riyadi, Imron. 2006. Isolasi Protoplas Tanaman Kacang Panjang Secara Enzimatis. Buletin Plasma Nutfah 12(2): 62–68.
- Shi, Guomin., Lina Yang and Tao He. 2016. Plant Regeneration from Protoplasts of *Gentiana straminea* Maxim. Open Life Science 11: 55–60.
- Sukmadjaja, Deden., Novianti Sunarlim., Endang G. Lestari., Ika Roostika dan Tintin Suharlina. 2007. Teknik Isolasi dan Kultur Protoplas Tanaman Padi. Jurnal AgroBiogen 3(2): 60–65.
- Tang, Jianian., Bingzhen Liu., Miao Chen., Yingbin Xue., Ying Liu and Zhengwei Wu. 2019. Isolation of Protoplast from Leaves of Castor (*Ricinus communis* L.). IOP Conference Series: Materials Sciences and Engineering 562: 1–5.
- Tomar, Uttar Kumar and Prem Kumar Dantu. 2010. Protoplast Culture and Somatic Hybridization. Cellular and Biochemical Sciences: 876–891.
- Wen, Fen., Su Wen-pan., Zheng Hua., Yu Benchu., Ma Zeng-feng., Zhang Peng and Guo Wen-Wu. 2020. Plant Regeneration via Protoplast Electrofusion in Cassava. Journal of Integrative Agriculture 19(3): 632–642.
- Wijanarka, Endang Sutariningsih Soetarto., Kumala Dewi dan Ari Indrianto. 2014. Intergenous Protoplast Fusion between *Pichia manshurica* and *Rhodospiridium paludigenum* to Increase The Production of Inulinase. Makara Journal of Science 18(4): 101–105.
- Wulandari, Dyah Retno., Agus Purwito., Slamet Susanto., Ali Husni dan Tri Muji Ermayanti. 2018. Protoplas Fusion Between Indonesian *Citrus maxima* (Burm) Merr. and *Citrus reticulata* L.: A Preliminary Report. Agrivita Journal of Agricultural Science 40(2): 233–241.