

IDENTIFIKASI TERJADINYA TRANSFER GEN PADA TANAMAN

(Review)

Donowati S. Tjokrokusumo

Peneliti Madya pada Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri

Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

Jalan M.H. Thamrin No. 8 Jakarta Pusat 10340 Indonesia

E-mail: tdonowati@yahoo.com

Abstract

Identification of somatic hybridization is one of the important steps to cope with that fusion and migration of gene to be analyzed. Therefore, following fusion various approaches have been used to identify hybrid materials. Putative somatic hybrids may be confirmed and characterized in a number of ways, depending upon the characteristics of the parental materials. Both characterization and identification methods are discussed in this paper.

Kata kunci: tanaman, rekayasa genetika, transfer gen, somatik, hybrida, identifikasi, karakterisasi.

1. PENDAHULUAN

Menurut Makmur (1988) bahwa kemajuan yang dicapai dalam berbagai bidang ilmu pengetahuan sangat mendukung ilmu pemuliaan tanaman, khususnya bioteknologi dan sitogenetika. Pemuliaan tanaman adalah suatu metoda yang secara sistematis merakit keragaman genetika tanaman menjadi suatu bentuk yang bermanfaat bagi kehidupan manusia, terutama dalam meningkatkan produksi pangan dunia (Makmur 1988). Menurut Tjokrokusumo (2003), bahwa munculnya ilmu bioteknologi tanaman memberikan kontribusi yang besar kepada manusia dalam memproduksi pangan dan industri pertanian melalui perbaikan tanaman atau pemuliaan tanaman, terutama dalam hal rekayasa genetika atau teknologi transformasi gen.

Dalam merekayasa genetika satu jenis tanaman diperlukan serentetan kerja yang membutuhkan ketelitian tinggi agar terjadi mutasi genetika seperti yang diharapkan. Sebelumnya penulis pernah menyampaikan suatu tulisan tentang pentingnya penerapan kultur sel dan jaringan tanaman dalam pengembangan industri pertanian (Tjokrokusumo 2003). Penulis menyimpulkan bahwa kultur sel dan jaringan tanaman sangat penting untuk membantu mempercepat seleksi pemuliaan tanaman melalui cara konvensional, disamping itu cara baru ini juga sifatnya akan mengurangi ruang yang digunakan dan kebutuhan tenaga kerja, dan yang paling

penting adalah memperoleh hasil yang tidak pernah diperoleh melalui cara *in vivo*. Namun demikian dibutuhkan tambahan kerja yang saling mendukung untuk memperoleh hasil yang optimal (Lindsey and Jones 1989). Sebagai tambahan untuk menghasilkan perubahan genetika dari kultur sel dan jaringan diperlukan sistem kultur protoplas yang dapat menghasilkan berbagai macam kemungkinan dalam suatu sistem manipulasi genetika, dan merupakan bagian yang penting dalam suatu proses keseluruhan yang dibutuhkan untuk suatu sistem rekayasa genetika tanaman. Menurut Old dan Primrose (1985) bahwa definisi manipulasi genetika adalah suatu formasi dari kombinasi baru dari bahan yang dapat diturunkan melalui cara memasukkan sel DNA asing dari luar sel dengan menggunakan virus, plasmid bakteri atau vektor lainnya agar dapat memungkinkan bergabungnya sel tersebut kedalam suatu organisme inang yang mana mereka secara alami tidak muncul di tempat tersebut tetapi mereka mampu berkembang secara terus menerus. Definisi ini merupakan definisi secara hukum benar guna untuk menekankan tentang cara propagasi yang memasukkan molekul DNA asing dalam suatu organisme inang yang berbeda. Kemampuan untuk melintasi halangan spesies alami dan menempatkan gene dari organisme apapun dalam suatu organisme inang yang tidak berhubungan merupakan suatu fakta bahwa sepotong DNA yang relatif sangat kecil dan

terdefiniskan dengan baik terpropagasi dalam suatu organisme inang.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Transformasi Gen

Transformasi gen adalah proses dimana DNA asing dimasukkan kedalam sel tanaman. Memasukkan informasi genetik asing kedalam sel tanaman telah muncul pada tahun 1970-an dan teknologi transfer gen telah berkembang sejak dilaporkan adanya tanaman yang sudah tertransformasi pada awal tahun 1980-an. Teknik transformasi ini sangat menarik untuk diterapkan pada tanaman yang mempunyai nilai komersial tinggi. Teknologi transfer gen telah diterapkan pada berbagai macam species dalam rangka membantu menghilangkan hambatan yang terjadi pada proses reproduksi melalui perkawinan. Metoda transformasi gen juga sangat banyak ragamnya, namun secara sederhana dapat dibagi menjadi dua, yaitu ada teknologi yang bersifat langsung dan adapula teknologi transfer gen secara tidak langsung (Tjokrokusumo, 1998). Hibrida somatik adalah penggabungan sel somatik yang membawa informasi genetik yang berbeda yang dapat dilakukan dengan menggunakan isolasi protoplast. Berbeda dengan kombinasi genom lengkap atau parsial dengan cara fusi protoplas, satu atau beberapa gen dapat dimasukkan langsung ke tanaman dengan suatu teknologi yang dikenal sebagai transfer gen spesifik yaitu untuk memasukkan karakter baru yang dikodekan oleh gen-gen ini secara langsung ke berbagai tanaman budidaya sehingga semua sifat yang menguntungkan tetap dipertahankan dan untuk menghindari pencampuran genetik (*genetic reassortment*) sebagaimana terjadi dalam prosedur penangkaran tanaman secara normal. Identifikasi hibrida somatik merupakan langkah awal yang harus dikerjakan dalam menganalisa keberhasilan suatu transformasi gen pada tanaman.

2.2. Identifikasi Hibrida Somatik

Ketika sel-sel heterokaryon telah diisolasi, baik dengan menggunakan mikropipet atau *cell sorter* (*alat penyeleksi sel*), kemudian sel-sel ini dapat dibiakkan untuk menghasilkan tanaman hibrida. Namun demikian biasanya sesudah fusi dilakukan, didapatkan campuran produk fusi dan parental. Oleh karena itu untuk membedakan benda-benda tersebut dilakukanlah berbagai cara yang telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi material

hibrida, diantaranya adalah termasuk yang berikut ini (Lindsey and Jones, 1989):

1. *Seleksi Komplementasi Mutan*. Berbagai jenis mutan tersedia dan dapat digunakan untuk seleksi. Mutan-mutan ini boleh jadi dari galur yang resistan terhadap antibiotik atau herbisida, mutan auxotroph atau mutan non-alelik pada enzim yang sama. Prinsip dasarnya adalah jika mutan A dapat tumbuh pada medium A (yang mengandung zat A sebagai penyeleksi atau membutuhkan nutrien A), dan mutan B dapat tumbuh pada medium B (yang mengandung zat B sebagai penyeleksi atau membutuhkan nutrien B), maka hanya hibrida somatik A+B yang dapat tumbuh dalam medium yang mengandung kedua zat penyeleksi A dan B.

2. *Komplementasi Mutan Nuclear Albino*. Kalus hibrida somatik dari dua galur albino non-alelik (nuclear) dapat berkomplemen dan menghasilkan koloni hijau/tanaman, yang dapat dipilih dari campuran koloni albino dan hijau sesudah fusi dan penanaman.

3. *Perbedaan Kultur*. Perbedaan kebutuhan media untuk jenis protoplas parental yang berbeda dapat digunakan untuk memperkaya atau menseleksi koloni hibrida.

4. *Fluorescence Activated Cell Sorters (FACS)*. Pemilah sel (Cell sorter) telah digunakan secara rutin untuk memisahkan jenis-jenis sel hewan dengan cara memberi label pada populasi sel dengan *marker fluorescence*, seperti *fluorescein* atau *rhodamine*. Sel bergerak satu-persatu dalam cairan melalui laser dan fotosel yang mendeteksi fluoresen, dan jenis-jenis sel yang berbeda diarahkan secara elektrostatis kedalam berbagai wadah (*container*). Cara ini sebelumnya terbukti secara teknik sulit digunakan pada protoplas tanaman, namun demikian dewasa ini metoda ini memberikan hasil yang cukup baik. Biasanya autofluoresen merah yang dihasilkan klorofil dalam protoplas daun digunakan sebagai salah satu *marker*, sedangkan populasi protoplas yang tidak berwarna dilabel dengan *fluorescein isothiocyanate* sebagai *marker* lainnya. Heterokaryon yang berlabel ganda dapat terdeteksi dan dipilih.

5. *Isolasi Heterokaryon Secara Mekanis*. Mikropipet gelas sederhana, yang ditempelkan pada syringe yang bersekrup, dapat digunakan untuk menyedot heterokaryon sel sambil dipelajari menggunakan mikroskop cahaya. Heterokaryon hasil fusi dua jenis protoplas (misalnya protoplas dari daun dan sel) dapat diidentifikasi dengan mudah secara visual.

6. *Kultur Masa*. Seleksi tidak dapat dilakukan secara dini setelah fusi, terutama pada protoplas dengan frekuensi fusi yang tinggi yang dibuat dengan cara *electrofusion*. Semua koloni yang

diperoleh dari fusi dikultur dan tunas hybrida dapat dideteksi menggunakan analisa isozyme atau marker morfologi.

2.3. Karakterisasi Hibrida Somatik

Sel yang diduga sebagai hybrida somatik dapat dipastikan kehybridaannya dan kemudian dikarakterisasi dengan berbagai cara, tergantung pada karakteristik material dari parental. Menurut Lindsey and Jones (1989) bahwa metoda atau cara pendekatan yang dapat dilakukan untuk menguji atau memastikan terjadinya proses hibridisasi antara lain adalah sebagai berikut:

- **Analisa Isoenzyme.** Jika material dari parental menghasilkan band yang berbeda pada gel setelah dilakukan pewarnaan untuk isozyme tertentu, hybrida biasanya menghasilkan sejumlah band yang merupakan jumlah band-band yang dihasilkan oleh kedua parental, dan mungkin juga dengan beberapa band tambahan yang dihasilkan dari kombinasi baru subunit-subunit enzim. Isozim yang biasa digunakan antara lain glukosa-6-fosfat dehidrogenase, fosfoglukosa isomerase, glutamin oxaloasetat transaminase, esterase dan shikimat dehidrogenase.

- **Analisa DNA Nukleus.** Jika DNA dari parental diekstraksi, difragmentasi dengan enzim restriksi, dipisahkan dengan menggunakan gel, ditransfer ke membran dan dilacak menggunakan fragmen DNA yang dilabel dengan ^{32}P , autoradiogram akan menunjukkan berbagai pola band hibridisasi. Hybrida somatik menunjukkan pola band sesuai jumlah band kedua parental.

- **Aktivitas Enzim.** Jika dua mutan yang komplementer, misalnya dari galur yang kehilangan nitrat reduktase (NR⁻) digunakan, kedua galur parental tidak dapat hidup dengan menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen, sebab keduanya tidak memiliki aktivitas nitrat reduktase. Hybrida dapat hidup dengan menggunakan nitrat sebagai sumber nitrogen, dan aktivitas enzim nitrat reduktase dapat diukur.

- **Morfologi.** Hybrida somatik mungkin juga menunjukkan struktur morfologi atau pigment yang berbeda, yang boleh jadi merupakan kombinasi dari sifat yang terdapat pada parental (misalnya rambut daun dari salah satu parental dan pigmen antosianin dari yang satu lagi), atau karakter yang benar-benar baru. Contoh karakter yang benar-benar baru pada kentang adalah kemunculan pigmen ungu gelap pada hybrid tuber yang didapat dari galur parental yang memiliki daging tuber berwarna kuning dan merah.

- **Analisa Kloroplas DNA.** Kloroplas DNA diekstrak, difragmentasi dan dipisahkan dengan menggunakan gel elektroforesis. Berbagai pola

fragmen DNA yang digunakan untuk alat diagnostik bagi parental dapat digunakan. Biasanya hanya kloroplas dari salah satu jenis protoplas parental ditemukan dalam hybrida individual, sehingga penyeleksian kloroplas terjadi pada saat pembiakan berlangsung dengan eliminasi salah satu populasi kloroplas.

- **Analisa DNA Mitokondria.** DNA mitokondria diekstrak dan dianalisa seperti di atas, biasanya menunjukkan bahwa rekombinasi genom mitokondria telah terjadi pada hybrid, sehingga pola band DNA yang unik untuk hybrida tertentu dapat diperoleh.

- **Analisa Sitologi.** Jumlah dan susunan kromosom hybrida somatik seharusnya dapat ditentukan dengan menggunakan ujung akar yang dihancurkan. Analisa seperti ini akan menunjukkan apakah hibrid tersebut memiliki jumlah dan susunan kromosom seperti yang diharapkan dari kedua orangtuanya, apakah lebih dari dua protoplas telah berfusi bersama, derajat aneuploidi, dan mungkin juga pertukaran yang terjadi antar kromosom. Aspek yang terakhir dapat dianalisa lebih jauh dengan menggunakan teknik hibridisasi *in situ*.

- **Analisa Karakter yang Diharapkan.** Kombinasi karakter agronomi yang berguna (seperti resistansi terhadap patogen) dapat dikaji dengan tes penangkaran standar.

Namun demikian menurut Wang *et al.* (2001), bahwa hybrida somatik dapat diidentifikasi dan karakterisasi dengan melalui beberapa tahapan, diantaranya adalah menggunakan (1) analisa morfologi, (2) pengamatan karakteristik agronomi, dan (3) sitologi dan analisa isoenzim yang menjadi dasar pertimbangan untuk menseleksi adanya hybrida somatik yang otentik. Adapun urutannya menurut Wang *et al.* (2001) dalam penelitian hybrida somatik pada tanaman kentang adalah sebagai berikut: (a) Pengamatan Morfologi, (b). Analisa Sitologi, (c). Analisa Isoenzim, (d). Analisa Kesuburan, (e). Karakteristik Agronomi.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknologi mikropopagasi secara *in vitro* mempunyai banyak keuntungan, diantaranya adalah dapat menghasilkan tanaman bebas virus dengan kecepatan yang tinggi karena mampu melipat gandakan dalam jumlah yang besar (Crouch *et al.* 1998). Teknik mikropopagasi telah dikembangkan selama dua dekade yang lalu dan sekarang teknik ini sudah sangat mapan (Banerjee and de Langhe 1985; Israeli *et al.* 1995; Cronauer and Krikorian 1984). Menurut Rowe and Rosales (1996) teknik mikropopagasi tanaman pisang memegang peranan penting dalam program

pengembangan perbaikan genetika tanaman pisang di seluruh dunia. Namun kelemahan teknik mikropropagasi terletak pada banyaknya variasi genetik yang dihasilkan pada tanaman pisang (Crouch *et al.* 1998), tetapi kebaikan dari terjadinya variasi somaklonal ini adalah dapat digunakan sebagai sumber variabilitas yang bermanfaat untuk dikembangkan lebih lanjut.

Jonhnsen & Veilleux (2001) mengatakan bahwa hibrida somatik telah berhasil diproduksi untuk beberapa spesies tanaman yang secara ekonomi sangat penting, seperti family Solanaceae, Rutaceae, Brassicaceae, Fabaceae, dan Poaceae.

Iwamoto *et al.* (2007) mengatakan bahwa protoplas kotiledon *Solanum integrifolium* diradiasi dengan UV dan protoplas kotiledon *Solanum sanitwongsei* diberi iodoacetamide, keduanya dielektrofusi dan dikultur. Tanaman yang berhasil regenerasi diklasifikasi kedalam 3 grup berdasarkan pada morfologi dan data genom hasil hibridisasi in situ. Morfologi grup yang pertama ternyata tergolong kelas menengah diantara 2 spesies induk lainnya. Tanaman berhasil berbuah dan bijinya mempunyai viabilitas cukup dan mempunyai jumlah kromosom $2n=48$ yang merupakan jumlah dari kromosom induk, yang menyatakan bahwa hasil dari hibrid fusi yang simetris. Morfologi tanaman yang di grup kedua lebih mirip dengan *Solanum integrifolium* dari pada grup pertama, dan mempunyai 2 set kromosom *Solanum integrifolium* dan satu set *Solanum sanitwongsei*. Berbeda dengan tanaman dari grup ketiga yang mempunyai satu set kromosom *Solanum integrifolium* dan 2 set *Solanum sanitwongsei*. Tanaman di grup kedua dan ketiga kurang vigor dibandingkan dengan tanaman di grup pertama dan hanya menghasilkan beberapa buah saja. Analisis elektroforesis dari isozyme shikimate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase dan phosphoglucose mutase, dan juga analisis RAPD menunjukkan bahwa dari 23 tanaman yang berhasil regenerasi dari ketiga grup tersebut ternyata merupakan hibrida somatik. Tanaman dari grup pertama lebih mempunyai vigor dari pada induknya dan menghasilkan lebih dari 500 biji per tanaman. Somatik hibrida yang subur yang diperoleh dari studi ini mungkin sangat cocok untuk digunakan sebagai calon **rootstock** tanaman terong.

Tippino *et al.* (2008), mengatakan bahwa pertukaran gen antara *Solanum melongena* dan sekutunya *Solanum aethiopicum* merupakan persyaratan yang sangat krusial untuk mengubah sifat sekutunya menjadi tanaman terong budidaya. Dalam rangka untuk mengevaluasi pengaruh rekombinan genetika antara dua spesies, maka dilakukan penggunaan marker biokimia dan

molekuler. Populasi dihaploid diperoleh melalui kultur anther yang berkorespon dengan hibrida somatik tetraploid secara genetika dianalisa. Pengaruh dari turunan disomik/tetrasomik dan rasio segregasi dari 3 isozymes dan ISSR (*inter-simple sequence repeat*) marker kemudian dievaluasi. Dihaploid yang diperoleh dari mikropores memungkinkan untuk dianalisa secara mudah, sempurna dan teliti. Segregasi dari 280 marker ISSR (110 khas *ethiopicum*, 104 khas *melongena* dan 66 monomorfik) dievaluasi dalam 71 dihaploid. Menurut konstitusi genetika (simplex, duplex dan triplex) hampir 64% fragmen muncul turunan tetrasomik dan atau disomik. Dalam kaitannya dengan fragmen khas ke khas, 68% dan 4% ambiguous hasil dari turunan tetrasomik dan disomik secara berurutan. Sebanyak 24 dari 66 monomorfik ISSR merupakan turunan berdasarkan pada segregasi chromatid acak. Fenotipe dari G-6-PDH, dan 6-PGDH dan SKDH dipelajari dalam 70 dihaploid dan inferensi telah dibuat tentang status sekutu dari 5 loci mereka. Markers isozyme mensegregasi dalam dihaploid dalam sifat yang terdistorsi, segregasinya tidak cocok dengan rasio segregasi yang diharapkan. Namun demikian turunan tetrasomik mungkin disarankan untuk loci G-6-PDH 2 dan SKDH 1. Hasilnya menunjukkan bahwa pertukaran gen segera terjadi dalam hibrida somatik antara *S. melongena* dengan *S. aethiopicum* gr. Gilo.

Mariska dan Husni (2006) mengatakan bahwa fusi protoplas dapat digunakan untuk mengatasi masalah dalam persilangan secara seksual, terutama inkompatibilitas dan sterilitas pada turunan F1. Masalah ini umumnya muncul pada persilangan antar genotipe berkerabat jauh, seperti pada tanaman lada, nilam, dan terung untuk memperoleh tanaman yang tahan terhadap penyakit yang disebabkan oleh *Phytophthora capsici* pada lada, *Ralstonia solanacearum* pada terung, dan nematoda *Pratylenchus brachyurus* pada nilam. Sifat ketahanan terhadap penyakit tersebut terdapat pada kerabat liarnya, tetapi persilangan secara seksual sering menghadapi hambatan genetik. Hibridisasi juga tidak dapat dilakukan pada tanaman nilam karena tanaman tersebut tidak berbunga. Isolasi protoplas dengan menggunakan kombinasi selulase 2% + macerozim 0,50% (untuk lada) dan selulase 0,50% + pektinase 0,50% (untuk terung dan nilam) menghasilkan protoplas dengan densitas yang tinggi. Fusi protoplas dapat dilakukan dengan menggunakan PEG 6000 konsentrasi 30% selama 20-25 menit untuk menyatukan dua protoplas tanaman budidaya dan kerabat liarnya dalam upaya membentuk hibrida somatik. Mikrokalus lada belum dapat diregenerasikan menjadi tunas

adventif, sedangkan untuk nilam telah diperoleh beberapa nomor hibrida somatik dengan kadar fenol dan lignin yang tinggi seperti kerabat liarnya. Pada terung, telah diperoleh beberapa hibrida somatik yang tahan terhadap penyakit layu *R. solanacearum*. Kultur anther dari tanaman hasil fusi dapat diperoleh tanaman dihaploid yang selanjutnya disilang balik dengan tetua hibridanya. Hasil silang balik (*back cross* 2) mempunyai struktur dan warna buah yang sama dengan terung budidaya.

Thawaro and Te-chato (2009) mengatakan bahwa RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) dan SSR (Simple Sequence Repeat) telah digunakan untuk mengadakan verifikasi dan variasi adanya somaklonal dari persilangan tanaman kelapa sawit 366(D) x 72 (P) *Elaeis guineensis* Jacq. DXP DNA dari MZE diisolasi dan dideteksi dengan menggunakan 7 primer dari RAPD dan 8 primer dari SSR. Variasi somaklonal diperoleh dari somatik embryogenesis yang dikultur dengan menggunakan media MS ditambah dengan berbagai macam dan konsentrasi auksin. Hasilnya menunjukkan bahwa semua primer dapat menunjukkan adanya DNA induk. Primer OPT06 (RAPD) dan EgC1R1772 (SSR) memberikan pola DNA yang nyata dan dapat digunakan untuk memverifikasi keturunan persilangan 366 (D) x 72 (P). Frekuensi yang tinggi pembentukan kalus diperoleh dari media MS dengan tambahan 2,50 mg/l 3,6 *dichloro-o-anisic acid* (*dicamba*).

See *et al.* (2003) mengatakan bahwa RFDD (*Restriction Fragment Differential Display*) digabung dengan FSD (*Family Specific Domain*) dari tanaman *Axonopus cupressus* untuk membedakan anggota famili gen selama proses somatik embriogenesis. Dengan menggunakan metoda ini mRNA yang terekspresi secara berbeda, AC1 dan AC2 yang mengandung chromo dan serine/threonine protein kinase diisolasi. Analisa sekuens menyatakan bahwa AC1 yang mencirikan MIP (plasma membran protein), dan AC2 menunjukkan homologi yang rendah terhadap serine/threonine protein kinase. Hasil awal ini menunjukkan bahwa RFDD-FSD merupakan suatu metoda yang cukup efisien untuk mengidentifikasi transkripsi yang berhubungan dengan famili gen.

Przetakiewicz *et al.* (2002), mengatakan bahwa marker yang khusus digunakan untuk menguji galur diploid kentang budidaya diidentifikasi dengan menggunakan PCR dengan menggunakan 10 primer yang membentuk RAPD atau dengan primer yang bersifat semi acak dengan target intron-exon sekuens yang sedikit bersifat konservatif untuk melihat gen tanaman. Lebih kurang 100 dan 50 primer RAPD dan 12 primer

yang bersifat semi acak diuji dan hasilnya menunjukkan bahwa hanya primer yang terseleksi saja yang digunakan untuk memverifikasi adanya hibrida somatik putatif.

Marasek *et al.* (2006) mengatakan bahwa uji morfologi kromosom telah dipelajari untuk menyelidiki kultivar diploid tanaman Tulip antara *Tulipa fosteriana* dengan *Tulipa gesneriana* ($2n=2x=24$) dan triploid hybrid Darwin ($2n=3x=36$). Berdasarkan analisa prokaryot, disarankan untuk menggunakan median kromosom sebagai marker. Analisa diskriminasi yang respek terhadap total panjang kromosom menunjukkan perbedaan yang nyata antara ukuran median kromosom *Tulipa fosteriana* dengan *Tulipa gesneriana*. Perbandingan antara panjang kromosom Tulip Hybrid Darwin menunjukkan adanya 2 kromosom yang lebih besar dan ada satu yang lebih kecil. Hasil ini menyarankan bahwa proses hibridisasi yang simultan dengan menggunakan metoda ini dapat menunjukkan perbedaan yang nyata untuk membedakan 24 kromosom dari *Tulipa gesneriana* dan 12 kromosom dari *Tulipa fosteriana*. Sehingga *in situ* genomic hibridisasi dan analisis median kromosom sangatlah berguna untuk mengidentifikasi Darwin Tulip dan keturunannya dapat dinyatakan dengan analisis sitometri menggunakan jaringan vegetatif Darwin Tulip. Hasil studi ini mengklarifikasi bahwa proses pembentukan kultivar hibrida tulip berjalan dengan baik dan akan sangat berguna untuk pemuliaan tanaman tulip dengan sistem hibridisasi interspesifik.

Xu *et al.* (2005) mengatakan bahwa FCM (Flow Cytometry), SSR (Simple Sequence Repeats) dan CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) digunakan untuk mengkarakterisasi tingkat komposisi ploida dan nuclear dan sitoplasma dari 2 (dua) hibrida somatik dari Changshou kumquat (*Fortunella obovata*), induk daun dan Dancy tangerine (*Citrus reticulata*), induk suspensi. FCM menunjukkan bahwa kedua hibrida somatik adalah tetraploid. Satu dari dua SSR pasangan primer dapat mendeteksi adanya polymorphism diantara induk fusi dan hibrida somatiknya menunjukkan profile pita yang berifat tambahan (additive banding profile) menunjukkan bahwa mereka merupakan hibrida tetraploid dengan nuklir DNA turunan dari kedua induknya. CAPS menunjukkan bahwa loci 4 dan 1 polimorfik diperoleh untuk kloroplas induk dan genom mitochondria, secara berurutan. Tanaman hibrida somatik mempunyai pola pita yang sama seperti induk suspensinya untuk semua marker kloroplas polimorfik dan pola pita mitochondria mendekati induk suspensi dengan kehilangan beberapa fragmen mtDNA. Penelitian ini memainkan peranan yang dalam mencari tahu

hubungan antara komposisi nuklir dan sitoplasmik, dan mirip seperti penampilan lapangan dari hibrida somatik di masa depan.

Tusa *et al.* (2002) mengatakan bahwa Milam (Citrus jambhiri Lush dan Femminello lemon (Citrus limon L. Burm.f.) hibrida somatik yang bersifat allotetraploid digunakan sebagai induk pollen dalam persilangan dengan diploid Femmenello lemon untuk menghasilkan mal secco toleran dalam populasi yang berbeda dari tipe lemon tidak berbiji triploid dengan kualitas buah yang bagus. Sejumlah 137 anakan diperoleh dan harus diuji untuk diseleksi dalam rangka untuk membedakan embrio zygotik dari nucellar dengan menggunakan metoda analisis FCM, isozyme dan ISSR-PCR (the inter simple sequence repeat polymerase chain reaction). Dari ketiga metoda tersebut, ternyata bahwa ISSR-PCR merupakan metoda yang paling efisien dan dapat diandalkan untuk mengidentifikasi anakan zygotik.

4. KESIMPULAN

- Identifikasi hibrida somatik dan karakterisasi adanya somatik hibrida merupakan langkah awal yang harus dikerjakan dalam menganalisa keberhasilan suatu transformasi gen pada tanaman.
- Teknologi/teknik hibrida somatik dapat digunakan untuk menghilangkan hambatan pada inkompabilitas seksual seperti pada pemuliaan tanaman kentang dan dapat bertindak sebagai suatu metoda untuk mentransfer karakteristik yang lebih baik, seperti ketahanan terhadap penyakit dan toleran terhadap serangan beku atau hujan es (*frost bite*) untuk sejumlah varietas kentang mulai dari kentang liar hingga kentang budidaya. Namun demikian masih ada banyak hambatan dalam pemuliaan tanaman kentang dengan menggunakan teknik hibrida somatik, karena keberhasilan teknik hibrida somatik sangat tergantung pada penyelesaian masalah dan hambatan serta keterbatasan teknik ini dalam pemuliaan dan perbaikan varietas kentang.
- Perbaikan tentang bagaimana meningkatkan frekuensi dan stabilitas fusi yang efektif, menyeleksi hibrida somatik secara cepat dan efisien, mengembangkan metoda kultur dan teknik kultur protoplas serta cara mengidentifikasi hibrida somatik dan juga menyelidiki variasi dan karakterisasi progeni hibrida somatik dimasa mendatang akan

diperlukan. Penting pula untuk dilakukan penelitian cara untuk memproduksi dan menggunakan hibrida yang tidak simetri dan cybrids serta menggunakan berbagai macam jenis protoplas seperti subprotoplas, miniprotoplas, micoprotoplas, citoplas dan protoplas seksual.

- *Backcrossing* hibrida somatik dengan tetraploid memberikan kemungkinan cara untuk memperbaiki hibrida somatik dan memungkinkan untuk memproduksi galur galur baru yang lebih baik.
- Penggabungan tehnik hibrida somatik dengan tehnik pemuliaan konvensional dapat merupakan suatu pendekatan baru dalam memperbaiki genetik dan pengembangan kultivar baru dalam pemuliaan tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Banerjee, N. and de Langhe, E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of Musa (banana and plaintain). *Plant Cell Report* 4:351-354.
- Cronauer, S.S., and Krikorian, A.D. 1984. Rapid multiplication of bananas and plaintains by in vitro shoot tip culture. *HortScience* 19:234-235.
- Crouch, J.H., Vuylsteke, D., Ortiz, R. 1998. Perspective on the application of biotechnology to assisst the genetic enhancement of plaintain and banana (Musa spp.). *Electronic Journal of Biotechnology* 1(1): 11-22.
- Israeli, Y., Lahav, E., and Reuveni, O. 1995. In vitro culture of bananas. In *Bananas and Plaintains*. S. Gowen. London Chapman & Hall pp. 147-178.
- Iwamoto, Y., Hirai, M., Ohmido, N., Fukui, K., and Ezura, H. 2007. Fertile somatic hybrids between Solanum integrifolium and Solanum sanitwongsei (syn. S. kurzii) as candidates for bacterial wilt-resistant rootstock of eggplant. *Plant Biotechnology* 24: 179-184.
- Johnson, A.A.T., and Veilleux, R.E. 2001. Somatic hybridization and application in plant breeding. *Plant Breeding Reviews* 20:167-225.

- Lindsey, K. And Jones, M.G.K., 1989. Plant Biotechnology in Agriculture. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Makmur, A., 1988. Pengantar Pemuliaan Tanaman. Cetakan kedua, Bina Aksara, Jakarta, Indonesia.
- Marasek, A., Mizuochi, H., and Okazaki, K. 2006. The origin of Darwin hybrid tulips analysed by flow cytometri, karyotype analyses and genomic in situ hybridization. *Euphytica* 151: 279-290.
- Mariska, I., dan Husni, A. 2006. Perbaikan sifat genotipe melalui fusi protoplas pada tanaman lada, nilam dan terung. *Jurnal Litbang Pertanian* 25(2):55-60.
- Old, R.W. and Primrose, S.B., 1985. Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering. Blackwell Scientific Publications, London, Great Britain.
- Przetakiewicz, J., Nadolska-Orczyk, A. and Orczyk, W. 2002. The use of RAPD and semi-random markers to verify somatic hybrids between diploid line of *Solanum tuberosum* L. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7:671-676.
- Rowe, P. and Rosales, F.E. 1996. Bananas and plaintains. In: Fruit Breeding. Vol 1: Tree and Tropical Fruits. J. Janick and J. Moore. New York, John Wiley pp.167-211.
- See, P.T., Rahman, S.S.A., Chin, C.F., and Harikrishna, K. 2003. Identification of Differentially expressed genes during somatic embryogenesis of *Axonopus compressus* by restriction fragment differential display-coupled FSD. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* (2003) Vol. 11 (2):71-76.
- Thawaro, S. and Te-chato, S. 2009. Application of molecular markers in the hybrid verification and assessment of somaclonal variation from oil palm propagated in vitro. *Science Asia* 35:142-149.
- Tippino, L., Mennella, G., Rizza, F., D'Alessandro, A., Shachakr, D., and Rotino, G.L. 2008. ISSR and Isozyme characterization of Androgenetic dihaploids reveals tetrasomic inheritance in tetraploid somatic hybrids between *Solanum melongena* and *Solanum aethiopicum* group Gilo. *Journal of Heredity* 99(3):304-315.
- Tjokrokusumo, D., 2003. Penerapan Kultur Sel dan Jaringan Tanaman dalam Industri Pertanian. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 2 (1): 72 – 80.
- Tjokrokusumo, D. 1998. Plant Transformation using pollen vacuum infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens*. M.Phil. Thesis, Murdoch University, Perth, Western Australia, Australia.
- Tusa, N., Abbate, L., Ferrante, S., Lucretti, S., and Scarano, M-T. 2002. Identification of zygotic and nucellar seedlings in Citrus interploidy crosses by means of isozymes, flow cytometry and ISSR-PCR. *Cellular&Molecular Biology Letters* 7:703-708. <http://www.cmbi.org.pl>
- Wang, D., Zhang, N., and Si H.J., 2001. Study on Protoplast Culture and Somatic Hybridization of Potato. National High-Technology Program of China in cooperation with the National Science Foundation of China and the Research Grant from the Ministry of Education of China.
- Xu, X., Liu, J., and Deng, X. 2005. FCM, SSR and CAPS analysis of intergration somatic hybrid plants between Changshou kumquat and Dancy tangerine. *Bot.Bull.Acad. Sin* 46:93-98.