

## REGENERASI PROTOPLAS TANAMAN TERUNG DAN KETAHANAN REGENERAN TERHADAP PENYAKIT BAKTERI LAYU [Regeneration of Eggplant Protoplast and The Resistance to Bacterial Wilt]

AliHusni

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,  
Jl. Tentara Pelajar No.3a Bogor 16111  
Telp. 0251-337975; E-mail:ali\_houzni@yahoo.com

### ABSTRACT

Protoplasts regeneration was studied on 3 cultivars of eggplant (purple, green, and white fruits) and the regenerant were tested for their resistance to bacterial wilt. The research was conducted in different steps, including protoplast isolation, protoplast purification, protoplast culture, cell suspension dilution, shoot regeneration, plantlet acclimatization, and testing for the resistant to bacterial wilt. Observations were made for protoplast number of each cultivar, protoplast cell wall formation, cell division, number of cell colony, microcalli, and shoot, percent of plantlet survival, in acclimatization, and the resistance of regenerants to bacterial wilt. Data was analyzed by calculating the average, percentage, and standard deviation. Results show that the combination of 0.5% cellulase Onozuka RS, 0.5% macerozyme R-10, 0.05% MES, and 9.1% mannitol in CPW solution was able to isolate a lot of protoplast ( $10^6$ ) in each cultivars. The first culture incubation with out light in both (KM8P and VKM) media and reach which 0,2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l zeatin, 1 mg/l IAA, promoted the formation of cell wall and cell division developed to microcalli. Regeneration media of MS, applied with vitamin MW, 0,1 mg/l NAA, and 2 mg/l zeatin produced 13 shoots. From 21 regenerants acclimatized only 15 regenerants survive. There were differences among the regenerants in their resistance to bacterial wilt, 3 regenerants resistant, 2 regenerant recovery (tolerant) and 10 regenerants were susceptible.

**Kata Kunci:** Tanaman terung, regenerasi protoplas, uji ketahanan, bakteri layu.

### PENDAHULUAN

Salah satu upaya yang dapat digunakan untuk meningkatkan produktivitas tanaman terung di Indonesia adalah menciptakan varietas/kultivar tahan terhadap penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum*. Untuk mengendalikan penyakit tersebut telah dilakukan upaya pengendalian secara biologis, mekanis, dan kimiawai. Namun demikian, upaya tersebut tidak efektif dan efisien. Upaya pengendalian yang dapat dilakukan secara efektif dan efisien adalah menggunakan varietas tahan. Untuk mendapatkan varietas/kultivar tahan diperlukan keragaman genetik yang luas. Keragaman genetik yang luas dapat dibuat melalui keragaman somaklonal secara *in vitro*.

Salah satu faktor yang dapat menyebabkan terjadinya variasi somaklonal adalah sumber eksplan (Silvarolla, 1992). Protoplas sebagai eksplan dalam variasi somaklonal memberikan peluang yang tinggi untuk mendapatkan variasi genetik, karena protoplas hanyalah sel telanjang yang hanya dilindungi oleh membran plasma (Margara, 1982). Berbeda dengan sel hewan, sel tanaman mempunyai sifat khusus

*totipotency Cell* yang mempunyai kemampuan secara autonom untuk beregenerasi menjadi tanaman utuh, seperti kultur sel atau protoplas. Sukses kultur sel diawali dari keberhasilan mengisolasi protoplas tanaman tanpa dinding sel dan dilanjutkan dengan keberhasilan regenerasi dinding sel dan meregenerasikan protoplas tunggal menjadi tanaman lengkap (Shepard *et al.*, 1983). Kesuksesan tersebut menyebabkan kultur protoplas mulai digunakan untuk penelitian mempelajari proses regenerasi sel, fusi sel, isolasi DNA, transfer gen dengan tujuan untuk menghasilkan tanaman unggul yang tahan terhadap cekaman biotik maupun abiotik serta mempunyai produksi dan kandungan gizi yang tinggi.

Airman (2003) mengatakan bahwa kultur *in vitro* dapat berperan penting dalam mengatasi masalah pertanian, seperti dapat mengatasi berbagai cekaman biotik maupun abiotik sehingga dapat membantu dalam mengatasi masalah produktivitas tanaman yang masih rendah.

Peningkatan keragaman genetik melalui variasi somaklonal menggunakan protoplas sebagai bahan keragaman telah berhasil dilakukan pada beberapa

tanaman. Variasi yang muncul dapat menghasilkan keragaman yang baik dari sifat morfologi dan ketahanan terhadap penyakit. Variasi somaklonal yang muncul dapat ditunjukkan oleh warna daun yang mempunyai bercak albino pada tanaman terung (Husni *et al*, 2003), tingkat ketahanan regenerasi padi terhadap aluminium (Utomo, 1997) dan keragaman pertumbuhan dan pembentukan umbi pada tanaman ubi jalar (Sihachakar *etal*, 1997).

Keberhasilan kultur protoplas sangat ditentukan oleh kemampuan regenerasi protoplas. Kemampuan regenerasi protoplas dipengaruhi oleh jenis eksplan, jenis media dasar, kondisi fisik media, dan zat pengatur tumbuh (zpt) yang digunakan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mempelajari regenerasi protoplas tanaman terung serta uji regenerasi terhadap penyakit bakteri layu.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor yang dilaksanakan selama bulan Pebruari - April 2002.

### **Isolasi protoplas**

Komposisi larutan enzim yang digunakan adalah 0,5% (ml/1) Sellulase Onozuka RS, 0,5% (M/v) Macerozim R-10 (Yakult Honsha Co), 0,05% (M/v) MES dan 9,1% (M/v) manitol dalam larutan CPW. Kemasaman (pH) larutan enzim dibuat menjadi 5,6. Sterilisasi larutan enzim dilakukan dengan filter berukuran 0,22 Mm.

Bahan tanaman yang digunakan sebagai sumber protoplas dalam penelitian ini adalah daun dari biakan *in vitro* 3 jenis kultivar terung, yaitu terung buah putih, buah ungu, dan buah hijau

Isolasi protoplas dimulai dari penggoresan bagian bawah epidermis daun secara merata dengan pisau dengan jarak  $\pm$  2-3 mm. Daun yang telah digores diapungkan ke dalam 6 ml larutan enzim yang telah diisi kedalam cawan petri berukuran 50 mm x 15 mm. Setiap cawan petri berisi 250-300 mg daun yang telah digores. Inkubasi daun dalam larutan enzim dilakukan

tanpa cahaya dalam inkubator yang suhunya diatur pada temperatur 27°C selama 6 dan 16 jam. Kemudian protoplas disaring agar terpisah dari jaringan daun dengan cara memipet larutan enzim yang berisi protoplas dengan nylon filter ukuran 100 dan 64 mm ke dalam tabung gelas. Selanjutnya dipindahkan dengan pipet ke dalam tabung sentrifus ukuran 15 ml dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 1800 rpm untuk membentuk endapan. Larutan enzim (supernatan) dibuang dengan cara memipet secara hati-hati agar endapan tidak terbawa. Kemudian endapan direduspensi dengan 10 ml larutan sukrosa 21 % untuk pemurnian protoplas dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan yang sama selama 10 menit. Protoplas yang mengapung pada bagian atas dipipet secara perlahan dan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus baru yang telah berisi larutan 0,5 M manitol + 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> untuk pencucian. Pencucian dilakukan untuk menghilangkan pengaruh enzim dan sukrosa. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit sehingga terbentuk endapan protoplas. Supernatan dibuang dengan cara memipet secara hati-hati sehingga tinggal endapan protoplas. Pencucian dilakukan 2 kali dengan larutan dan cara yang sama.

Penghitungan protoplas dilakukan dengan cara mereduspensi endapan protoplas dengan larutan pencuci sebanyak 2-3 ml. Kemudian diambil 0,1 ml suspensi protoplas lalu diencerkan dengan larutan pencuci sebanyak 0,9 ml. Kemudian dimasukkan dalam gelas haemositometer lalu dilakukan penghitungan protoplas secara mikroskopis.

### **Kultur protoplas**

Medium pertumbuhan protoplas yang digunakan adalah KM8p dan VKM dengan penambahan zat pengatur tumbuh (zpt) 0,2 mg/12,4-D, 0,5 mg/1 Zeatin, dan 1,0 mg/1 NAA dengan pH 5,7-5,8 yang disterilisasi dengan filter ukuran 0,22 mm. Kultur protoplas dilakukan dengan metoda Sihachakar (1998) dengan cara mengencerkan densitas protoplas dari masing-masing kultivar menjadi 10<sup>4</sup> sebelum dikultur dalam medium. Kemudian suspensi protoplas diambil 0,1 ml dengan pipet dan dimasukkan ke dalam cawan petri (50 mm x 15 mm) yang telah berisi 6 ml media cair. Kultur diinkubasi pada ruang gelap

pada temperatur 27°C sampai protoplas mampu membentuk dinding sel. Kemudian kultur dipindahkan ke dalam ruang inkubasi yang diberi cahaya dengan intensitas 1000 lux selama 12 jam untuk mendorong pembelahan sel.

Untuk mendorong pertumbuhan dan perkembangan sel membentuk koloni sel dan mikrokalus dilakukan pengenceran media agar densitas sel tidak terlalu tinggi. Pengenceran dilakukan dengan cara membagi 3 setiap cawan petri suspensi protoplas ke cawan petri baru yang telah berisi media dasar yang sama (KM8P dan VKM), tetapi komposisi zpt yang digunakan diganti dengan 0,1 mg/12,4-D dan 2,0 mg/1 BA. Kultur diinkubasi kembali pada ruang inkubasi yang diberikan cahaya dengan intensitas 1000 lux selama 12 jam sampai terbentuk mikrokalus dan kalus.

Pengamatan dilakukan secara mikroskopis terhadap pembentukan dinding dan pembelahan sel, pembentukan koloni sel dan mikrokalus.

#### Regenerasi tunas

Media regenerasi yang digunakan adalah media padat MS + vitamin MW, 20 g/l sukrosa, 2 g/l gelrite, 0,1 mg/l IAA dan penambahan 1,2 dan 3 mg/l zeatin sebagai perlakuan. Mikrokalus yang terbentuk setelah terlihat jelas dengan kasat mata diambil dengan pinset dan dipindahkan pada media regenerasi. Tunas yang terbentuk dipindahkan ke dalam media MS, vitamin MW, 30 g/l sukrosa, 2 g/l gelrite tanpa zpt untuk mempercepat pertumbuhan dan perkembangannya setiap regenerasi serta diinkubasi dalam ruangan yang diberi cahaya dengan intensitas 1000 lux selama 12 jam pada suhu 25-27°C.

#### Uji ketahanan regenerasi terhadap penyakit bakteri layu

Uji ketahanan terhadap penyakit bakteri layu dilakukan pada tanaman yang hidup dari semua regenerasi yang dihasilkan pada umur 6 minggu setelah aklimatisasi.

Persiapan inokulasi dilakukan dengan cara membuat suspensi *Ralstonia solanacearum* dengan OD=0,1 ( $10^7$  sel/ml). Metode inokulasi yang dilakukan adalah metoda Mulya *et al.* (2000) dengan cara memotong akar tanaman dalam tanah dengan bentuk L pada setiap polibag. Setelah itu disiram dengan suspensi bakteri masing-masing dengan volume 2 ml/polibek pada bagian yang dilukai.

#### HASIL

##### Isolasi Protoplas

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama inkubasi dalam larutan enzim kombinasi 0,5% selulase onozuka-RS dan 0,5% macerozym R-10 sangat mempengaruhi densitas protoplas yang dihasilkan. Inkubasi 6 jam dalam larutan enzim hanya menghasilkan protoplas yang sangat sedikit ( $10^2$ ), sedangkan inkubasi 16 jam dapat menghasilkan protoplas dalam jumlah banyak ( $10^5$ ) pada semua kultivar terung yang digunakan. Protoplas yang dihasilkan bersifat viabel yang ditunjukkan oleh bentuknya yang bulat sempurna. Densitas protoplas paling banyak berasal dari kultivar terung buah ungu yaitu  $14,3 \times 10^5$  protoplas/g daun, kemudian diikuti kultivar terung buah putih  $14,1 \times 10^5$  dan kultivar terung buah hijau  $12,9 \times 10^5$  (Tabel 1). Dari Tabel tersebut dapat dilihat bahwa rata-rata densitas protoplas antara kultivar terung buah

**Tabel 1.** Pengaruh lama inkubasi terhadap densitas protoplas yang dihasilkan dari setiap jenis terung.

| Kultivar          | Jumlah Protoplas/g daun     |                             |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|                   | Inkubasi 6 jam              | Inkubasi 16 jam             |
| Terung buah ungu  | $15,1 \times 10^3,12$       | $14,3 \times 10^6,34$       |
| Terung buah hijau | $10,6 \times 10^2 \pm 2,10$ | $12,9 \times 10^5 \pm 2,04$ |
| Terung buah putih | $11,4 \times 10^2 \pm 5,17$ | $14,1 \times 10^5 \pm 3,89$ |

ungu dan kultivar terung buah putih tidak terlalu berbeda. Sedangkan densitas protoplas dari kultivar terung buah hijau lebih sedikit dibanding dengan kultivar terung buah ungu dan buah putih.

**Kultur Protoplas.**

Protoplas dapat beregenerasi membentuk dinding sel baik pada media KM8P maupun pada media VKM. Media KM8P lebih baik dari pada media VKM untuk regenerasi dinding sel pada semua protoplas kultivar terung yang digunakan. Kemampuan regenerasi dinding sel paling tinggi berasal dari kultivar terung buah ungu sebesar 50,67% pada media KM8P dan 41 % pada media VKM, diikuti kultivar terung buah hijau sebesar 39% pada media KM8P dan 20,67% pada media VKM serta kultivar terung buah putih sebesar 25,67% pada media KM8P dan 17,67% pada media VKM. Data pengamatan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh jenis media dasar (KM8P dan VKM) terhadap persentase kemampuan protoplas beregenerasi membentuk dinding sel, 1 minggu setelah kultur

| Kultivar terung | Regenerasi clindindg sel (%) |       |
|-----------------|------------------------------|-------|
|                 | KM8P                         | VKM   |
| Buah ungu       | 50,67                        | 41,0  |
| Buah hijau      | 39,0                         | 20,67 |
| Buah putih      | 25,67                        | 17,67 |

Dinding sel mulai terbentuk 24 jam setelah kultur yang ditandai dengan bentuk sel yang tidak bulat lagi. Pemandangan kultur ke ruang inkubasi yang diberi cahaya 1000 lux 1 minggu setelah kultur dapat mempercepat penebalan dinding sel dan mampu melakukan pembelahan membentuk koloni-koloni sel. Perubahan warna media dari jernih menjadi keruh keputihan di mulai pada minggu ke dua setelah kultur. Perubahan warna media tersebut disebabkan oleh koloni-koloni sel yang terbentuk semakin banyak dari hasil pembelahan sel yang terus-menerus. Banyaknya jumlah koloni sel yang dihasilkan dari masing-masing media dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh jenis media dasar (KM8P dan VKM) yang digunakan terhadap kemampuan protoplas membentuk koloni sel pada setiap kultivar terung, 2 minggu setelah kultur.

| Kultivar   | Jumlah koloni sel/6 ml medium |      |
|------------|-------------------------------|------|
|            | KM8P                          | VKM  |
| Buah ungu  | 17                            | 14   |
| Buah hijau | 7,67                          | 6    |
| Buah putih | 2                             | 1,67 |

Rata-rata jumlah koloni sel yang dihasilkan pada setiap bidang pandang adalah 17 koloni untuk kultivar terung buah ungu pada media KM8P dan 14 koloni pada media VKM, 7,67 koloni untuk kultivar terung buah hijau pada media KM8P dan 6 koloni pada media VKM serta 2 koloni untuk kultivar terung buah putih pada media KM8P dan 1,67 pada media VKM.

Pengenceran Kultur dilakukan dengan tujuan untuk mempertahankan viabilitas sel, memacu pertumbuhan dan perkembangan koloni sel membentuk mikrokalus dan kalus. Dari hasil pengenceran diperoleh hasil bahwa koloni sel dapat tumbuh dan berkembang membentuk mikro kalus. Kecepatan pertumbuhan dan perkembangan sel membentuk mikrokalus sangat dipengaruhi jenis media dasar yang digunakan. Rata-rata, jumlah mikrokalus yang dihasilkan adalah sebanyak 5,7 pada media KM8P dan 2,4 pada media VKM untuk kultivar terung buah ungu, 1,8 pada media KM8P dan 0,6 pada media VKM untuk kultivar terung buah hijau. Untuk kultivar terung buah warna putih tidak diperoleh adanya mikro kalus akibat kultur terkontaminasi jamur. Bila dilihat dari total mikrokalus yang dihasilkan, diperoleh 52 mikrokalus dari kultivar terung buah ungu yang terdiri dari 40 mikrokalus dari media KM8P dan 12 mikrokalus dari media VKM. Sedangkan untuk kultivar terung buah hijau diperoleh sebanyak 12 mikrokalus yang terdiri dari 9 mikrokalus dari media KM8P dan 3 mikrokalus dari media VKM (Tabel 4).

Penampakan protoplas yang dihasilkan sampai terjadi pembelahan sel membentuk koloni sel dan mikrokalus dapat dilihat pada Foto 1.

**Tabel 4.** Pengaruh jenis media dasar (KM8P dan VKM) terhadap kemampuan protoplas membentuk mikrokalus, 3 minggu setelah pengenceran.

| Kultivar terung   |      | Rata-rata jumlah mikro kalus | Total Mikrokalus |
|-------------------|------|------------------------------|------------------|
| Jenis media dasar |      |                              |                  |
| <b>Buahungu</b>   |      |                              |                  |
|                   | KM8P | 5,7                          | 40               |
|                   | VKM  | 2,4                          | 12               |
| <b>Buah hijau</b> |      |                              |                  |
|                   | KM8P | 1,8                          | f                |
|                   | VKM  | 0,6                          | 3                |
| <b>Buah putih</b> |      |                              |                  |
|                   | KM8P | 0                            | 0                |
|                   | VKM  | 0                            | 0                |



**Foto 1:** Tahapan pertumbuhan dan perkembangan protoplas mulai dari kiri atas searah jarum jam adalah protoplas hasil isolasi, pembelahan sel, koloni sel dan mikro kalus.

**Regenerasi tunas**

Dari 52 kalus terung kultivar buah ungu yang diregenerasikan dapat menghasilkan 5 tunas dari media penambahan 1 mg/1 zeatin dengan keberhasilan sebesar 33,3% dan 13 tunas dari 2 mg/1 zeatin dengan keberhasilan 86,7%. Sedangkan kalus dari kultivar terung buah hijau menghasilkan 1 tunas yang berasal dari dari 1 mg/1 zeatin dengan keberhasilan sebesar 25% dan 2 tunas dari 2 mg/1 zeatin dengan keberhasilan 50% (Tabel 5). Penampakan kalus yang dapat beregenerasi membentuk tunas berasal dari kalus

embriogenik yang ditandai dengan adanya nodul yang mengkilap berwarna hijau kekuningan dan kemudian membentuk bakal tunas dan tunas. Sedangkan kalus yang tidak dapat beregenerasi umumnya berbentuk

**Tabel5.** Pengaruh konsentrasi zeatin terhadap kemampuan regenerasi tunas dari kalus terung kultivar buah ungu dan terung kultivar buah hijau.

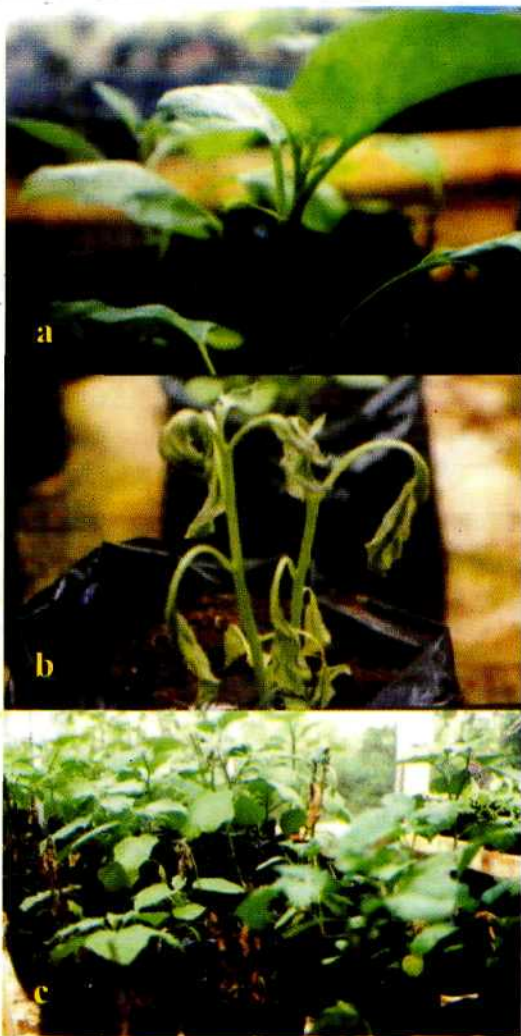
| Kultivar terung   | Jumlah tunas/kalus yang tumbuh | Keberhasilan regenerasi tunas (%) |
|-------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Buah ungu</b>  |                                |                                   |
| 1                 | 5/15                           | 33,3                              |
| 2                 | 13/15                          | 86,7                              |
| 3                 | 0/15                           | 0                                 |
| <b>Buah hijau</b> |                                |                                   |
| 1                 | 1/4                            | 25                                |
| 2                 | 2/4                            | 50                                |
| 3                 | 0/4                            | 0                                 |

kompak dan kering dengan warna keputihan atau berwarna kuning kecoklatan.

**Uji ketahanan terhadap penyakit layu bakteri**

Dari 18 regeneran kultivar terung buah ungu dan 3 regeneran kultivar terung buah hijau yang diaklimatisasi diperoleh 15 regeneran yang hidup yang terdiri dari 12 regeneran dari kultivar buah ungu dan 3 regeneran dari buah hijau. Dari hasil pengujian yang dilakukan terhadap 15 regeneran tersebut diperoleh 3 klon yang tidak menunjukkan gejala penyakit layu

bakteri setelah dilakukan inokulasi dengan suspensi mikroba *R. solanacearum* yaitu RU4, RU5 dan RH2. Selain itu terdapat 2 regeneran yang mengalami recovery (segar kembali) setelah terjadi gejala layu yaitu RU15 dan RH3. Regeneran yang lainnya mati pada minggu pertama sampai minggu kedua. Gejala layu mulai tampak pada hari ke 3 setelah inokulasi yang ditandai dengan adanya daun yang layu dan mati pada minggu pertama. Tetapi ada juga regeneran yang gejalanya tampak pada awal minggu kedua dan mati pada akhir minggu ke dua. Sedangkan regeneran yang tahan tidak tampak adanya gejala serangan setelah 15



**Foto 2:** Penampakan regeneran setelah dilakukan uji ketahanan terhadap penyakit bakteri layu (a=regeneran yang tahan, b=regeneran yang tidak tahan dan c= komunitas regeneran setelah pengujian)

hari inokulasi. Penampakan dari regeneran yang mati dan yang hidup setelah 15 hari diinokulasi dengan *R. solanacearum* dapat dilihat pada Foto 2.

## PEMBAHASAN

### Isolasi protoplas

Rendahnya densitas protoplas yang dihasilkan dari inkubasi 6 jam dalam larutan enzim diduga disebabkan oleh konsentrasi macerozim (0,05%) yang terlalu rendah sehingga proses pemisahan antar sel menjadi sel tunggal lebih lama. Husni *et al.* (2003) mengatakan bahwa proses isolasi protoplas dalam larutan enzim didahului oleh aktivitas macerozim untuk mendegradasi pektin yang ada diantara sel dan dilanjutkan oleh aktivitas selulase mendegradasi dinding sel sehingga diperoleh protoplas. Dengan demikian proses degradasi pektin yang terdapat diantara sel menggunakan macerozim 0,05% membutuhkan waktu yang lebih lama. Sehingga densitas protoplas yang dihasilkan dari semua kultivar terung juga sedikit ( $10^2$  protoplas/ml). Sedangkan protoplas yang dihasilkan dengan waktu inkubasi yang lebih lama (16 jam) menghasilkan protoplas dengan densitas tinggi dari semua kultivar terung yang digunakan ( $10^7$  protoplas/ml).

Bila dilihat densitas protoplas yang dihasilkan dari setiap kultivar terung yang digunakan terdapat perbedaan hasil yang diperoleh. Densitas protoplas yang dihasilkan dari kultivar terung buah hijau lebih sedikit dibandingkan densitas protoplas kultivar terung buah ungu dan buah putih. Hal ini ada kaitannya dengan daya tumbuh kultivar tersebut dalam media *in vitro* lebih lambat dari daya tumbuh kultivar terung buah ungu dan putih. Selain itu luas daunnya juga lebih kecil dibanding kultivar terung buah ungu dan buah putih. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Purwito (1999) pada tanaman kentang, dimana tanaman kentang yang mempunyai daya tumbuh cepat dan daunnya lebih lebar akan menghasilkan protoplas yang lebih banyak dibanding tanaman yang mempunyai daya tumbuh lemah.

### Kultur protoplas

Dinding sel mulai terbentuk setelah 24 jam pada media kultur yang ditandai dengan keadaan

bentuk protoplas yang tidak bulat lagi. Menurut Burgess (1983), regenerasi dinding sel terjadi dengan cara penimbunan mikrofibril selulosa pada permukaan membran plasma sehingga ukuran protoplas akan meningkat karena isi sel bertambah banyak. Selain itu, aktivitas metabolisme sel juga menjadi meningkat. Menurut Vasil dan Vasil (1980), selama regenerasi dinding sel terjadi peningkatan jumlah organel sel, aliran sitoplasma, respirasi dan sintesis RNA, protein dan polisakarida. Pemberian cahaya pada sel protoplas yang telah membentuk dinding sel dapat mempercepat penebalan dinding sel sehingga sel menjadi sempurna dan mampu melakukan pembelahan membentuk sel-sel baru (Sihachakr, 1998).

Minggu pertama setelah kultur sudah terlihat beberapa koloni sel dengan sel yang lebih panjang. Pada tahap ini dapat dilihat adanya perbedaan sel yang viabel dengan sel yang tidak viabel. Sel yang viabel ditandai dengan semakin banyaknya jumlah sel muda pada setiap koloni dengan berwarna bening dan mempunyai inti yang besar. Sedangkan sel atau koloni sel yang tidak viabel berwarna kecoklatan sampai kehitaman. Pada minggu kedua setelah kultur terlihat adanya perubahan warna media dari jernih menjadi keruh. Hal ini disebabkan bertambah banyaknya jumlah sel akibat pembelahan sel yang terus-menerus. Sihachakr (1998) menyatakan bahwa densitas sel yang terlalu banyak dalam medium akan menyebabkan penurunan kemampuan sel untuk melakukan pembelahan, sehingga perlu pengenceran medium dengan media baru untuk mempertahankan kemampuan sel melakukan pertumbuhan dan perkembangan. Hal yang sama juga dilakukan Purwito (1999) pada studi regenerasi protoplas tanaman kentang.

Pengenceran kultur dapat mempertahankan viabilitas sel, memacu pertumbuhan dan perkembangan koloni sel membentuk mikrokalus dan kalus. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya mikrokalus yang dapat terlihat dengan kasat mata satu minggu setelah pengenceran dengan warna putih kekuningan. Kecepatan pertumbuhan dan perkembangan sel membentuk mikrokalus sangat dipengaruhi jenis media dasar yang digunakan. Hal ini sesuai dengan penelitian Purwito (1999) pada tanaman kentang dan Husni *et al.* (2004) pada

tanaman terung hasil fusi dimana pembelahan sel semakin cepat setelah dilakukan pengenceran sehingga jumlah mikrokalus yang terbentuk semakin bertambah banyak.

### **Regenerasi tunas**

Jenis media dasar, konsentrasi dan zpt yang digunakan sangat mempengaruhi keberhasilan regenerasi tunas. Media regenerasi yang biasa digunakan pada genus solanum sangat banyak seperti media dasar MS yang dimodifikasi. Keberadaan zpt zeatin dan IAA dalam kultur protoplas hampir selalu digunakan (Haberlach, 1985).

Pada penelitian ini digunakan media MS + vitamin MW + 0,1 mg/l IAA + zeatin 1, 2 dan 3 mg/l. Dari perlakuan konsentrasi zeatin yang digunakan, hanya perlakuan 1 dan 2 mg/l yang dapat menghasilkan tunas. Hal ini sesuai dengan pernyataan Haberlach, (1985) ) dimana konsentrasi zeatin yang biasa digunakan pada kultur protoplas adalah antara 0,2 - 2,0 mg/l dan 0,1 - 0,5 mg/l IAA. Penambahan 3 mg/l zeatin tidak dapat menghasilkan tunas karena sifat kalus yang dihasilkan sangat kompak. Sedangkan penampakan kalus yang dapat beregenerasi membentuk tunas berasal dari kalus embriogenik yang ditandai dengan adanya nodul yang mengkilap berwarna hijau kekuningan dan kemudian membentuk bakal tunas dan tunas. Sedangkan kalus yang tidak dapat beregenerasi umumnya berbentuk kompak dan kering dengan warna keputihan atau berwarna kuning kecoklatan.

Tunas yang dihasilkan diisolasi dan dipindahkan pada media baru yang sama dengan media regenerasi, tetapi tanpa penambahan zat pengatur tumbuh untuk merangsang perkembangannya. Pada media tersebut terjadipemanjangan tunas dan sekaligus terbentuk akar yang sangat menentukan keberhasilan dalam aklimatisasi.

### **Uji ketahanan terhadap penyakit layu bakteri.**

Dari hasil pengamatan 20 hari setelah inokulasi dengan *R. Solanacearum* terhadap 15 regeneran yang masih hidup setelah masa aklimatisasi diperoleh 3 regeneran yang tidak menunjukkan gejala penyakit bakteri layu yaitu RU4, RU5 dan RH2. Selain itu terdapat 2 regeneran yang mengalami recovery (segar

kembali) setelah terjadia gejala layu yaitu RU15 dan RH3. Regeneran lainnya mati pada minggu pertama sampai minggu kedua. Adanya perbedaan ketahanan regeneran terhadap penyakit bakteri layu dapat disebabkan oleh terjadinya variasi genetik. Variasi yang muncul dapat berasal dari sifat sel dari eksplan atau perubahan genetik selama priode pengkulturan (Silvarolla, 1992) atau adanya perubahan dalam hal jumlah kromosom dan beberapa sifat penting lainnya yang disebabkan oleh priode kultur yang terlalu lama atau penggunaan zpt yang terlalu tinggi (Hendre, 1983). Dari berbagai hasil penelitian kultur protoplas dapat dihasilkan varian-varian dengan sifat baru baik secara morfologi maupun sifat ketahanan terhadap penyakit.

#### KESMFCLAN

Lama inkubasi eksplan dalam larutan enzim pada proses isolasi protoplas sangat menentukan jumlah protoplas yang dihasilkan. Inkubasi eksplan selama 6 jam dalam larutan enzimnya menghasilkan protoplas dengan densitas rendah ( $10^2$ ) sedangkan eksplan selama 16 jam dalam larutan enzim kombinasi 0,5% selulase Onozuka RS dan 0,5% maserozim R-10 dengan penambahan 0,05% MES dan 9,1% manitol dalam larutan CPW pada pH 5,5-5,6 dapat menghasilkan protoplas dengan densitas tinggi ( $10^8$ ) pada ke-3 kultivar yang digunakan.

Media KM8P dengan penambahan 0,2 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l zeatin dan 1 mg/l NAA lebih baik dari pada VKM untuk mendorong regenerasi dinding dan pembelahan sel protoplas membentuk koloni sel. Pengenceran susupensi sel dengan media dasar yang sama tetapi zpt diganti dengan 0,1 mg/l 2,4-D dan 2 mg/l BAP dapat mendorong pertumbuhan sel membentuk mikro kalus. Kalus dapat diregenerasi membentuk tunas menggunakan media regenerasi MS, vitamin MW, 0,1 mg/l IAA, dan 2 mg/l zeatin.

Terdapat 3 regeneran (RU4, RU5 dan RH2) yang tidak memperlihatkan adanya gejala dan 2 regeneran (RU15 dan RH3) yang pulih kembali setelah dilakukan inokulasi dengan *R. Solanacearum*.

#### DAPTAR PUSTAKA

Altman A. 2003. From Plant Tissue Culture to Biotechnology Science Revolution. Abiotic Stress

Tolerance, and Forestry. In vitro *Cell Dev. Biol-Plant* 39,79-84.

- Burgess J.** 1983. Wall regeneration around isolated protoplasts. 55-77. In: Giles KI (Ed.). *International Review of Cytology, Supplement 16*. Academic. A subsidiary of Harcourt Brace Javonich Publ. New York.
- Haberlach GT, Cohen BA, Reichert NA, Bear MA, Towill LE and Hegelson JP.** 1988. Isolation culture, and regeneration of protoplasts from potato and several related *Solanum* species. *Plant Sci* 39, 67-74.
- Hendre RR, Kotwal M, Khuspe SS and Mascarenhas AF.** 1983. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. *Sugar Cane* 1,5-10.
- Husni A, Wattimena GA, Mariska I dan Purwito A.** 2003. Keragaman genetik tanaman terung hasil regenerasi protoplas. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 8(2), 52-59.
- Husni A, Mariska I dan Hobir.** 2004. Fusi protoplas dan regenerasi hasil fusi antara *Solanum melongena* dan *Solanum torvum*. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 9(1), 1-7.
- Margara J.** 1982. Gonslagen van vegetative vermeerdering. p. 23-26. *Nederlands Vereniging Van Plantecel en Weefselweek* (NVPM), Postbus 48, Wageningen.
- Mulya K, Hasnam N, Mariska I, Adhi AM, Rahayu S dan Karyani R.** 2000. Source of resistance against bacterial wilt disease on wild species of *Solanum*. *J. Biol. Indonesia* 2(7), 299-305.
- Purwito A.** 1999. Fusi protoplas intra dan interspesies pada tanaman kentang. *Disertasi Pasca Sarjana*, Institut Pertanian Bogor.
- Shepard JF, Bidney D, Barsby TI and Kemble RJ.** 1983. Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion. *Science* 219, 683-686.
- Sihachakr D, Serraf I, Chaput MH, Mussio I, Rossignol L and Ducreux G.** 1995. Regeneration of plants from protoplasts of *S. khasianum* C.B. Clark and *S. laciniatum* Ait. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 34, 109-120.
- Sihachakr D.** 1998. Culture Media and Protocols for Isolation and Fusion of Protoplasts of Eggplant. *Morphogenesis Vegetale Experimentale* Bat.360. Universite Paris, France. (Tidak dipublikasi).
- Silvarolla MB.** 1992. Plant genomic alterations due to tissue culture. *J. Brazil. Assoc. Adv. Sci.* 44,329-335.