

Teknik Isolasi dan Kultur Protoplas Tanaman Padi

Deden Sukmadjaja, Novianti Sunarlim, Endang G. Lestari, Ika Roostika, dan Tintin Suhartini

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

Isolation and Culture Techniques of Rice Protoplasts. Deden Sukmadjaja, Novianti Sunarlim, Endang G. Lestari, Ika Roostika, and Tintin Suhartini. Protoplast fusion or somatic hybridization technology is an alternative technology for production hybrids of plants that are difficult to be produced by conventional methods due to their sexual incompatibility. An experiment was conducted to develop techniques for isolation, purification, and culture of rice protoplasts of cultivar IR64 and a wild rice species (*Oryza officinalis*). Optimization of protoplast isolation and purification methods from both rice genotypes were successfully done. The highest protoplast density was obtained by digesting embryonic callus or stems of young seedling in an enzyme solution containing of 2% cellulose, 0.1% pectolyase, 0.5% macerozyme, 0.5% driselase, 5 mM ES, and 13% mannitol in CPW solution. The protoplast digestion was done for three hours by soaking in the enzyme solution followed by shaking at 50 rpm under a room temperature. Purification of the protoplasts were done by separating them from plant debris using a 25% sucrose solution. Protoplast regeneration was not successful using although different media compositions and conditions. Growth process from cell division to cell aggregate was only successful on IR64 protoplast culture on a medium that contained AgNO₃.

Key words: Protoplasts, isolation and culture, cultivated and wild rices.

PENDAHULUAN

Salah satu cara untuk mengatasi masalah dalam pengembangan tanaman padi unggul adalah dengan merakit varietas baru yang berproduksi tinggi dan tahan terhadap hama, penyakit serta cekaman abiotik. Beberapa cara yang dapat diterapkan untuk mendapatkan varietas baru antara lain melakukan persilangan dengan spesies tertentu, melakukan mutasi buatan, penerapan metode transformasi atau melakukan fusi protoplas.

Penggunaan metode transformasi adalah cara yang paling ideal untuk mentransfer gen yang diinginkan secara efisien tanpa dibatasi oleh halangan seksual dan hubungan kedekatan taksonomi (Ramulu *et al.* 1996). Namun demikian, pelaksanaannya tidak mudah dan memerlukan rangkaian kegiatan yang panjang seperti rekonstruksi gen, optimasi teknik transformasi, regenerasi, dan sebagainya. Selain itu, metode

transformasi hanya dapat dilakukan pada sifat-sifat genetik yang disandi oleh gen tunggal. Beberapa sifat yang disandi oleh banyak gen yang terletak di dalam satu kromosom atau pada beberapa kromosom tanaman sangat sulit diidentifikasi dan diisolasi sehingga penerapannya menjadi sulit dilakukan (Millam *et al.* 1995, Ramulu *et al.* 1996). Penggunaan metode fusi protoplas atau hibridisasi somatik merupakan alternatif teknologi yang dapat diterapkan untuk mengatasi masalah tersebut. Selain dapat mentransfer gen-gen yang belum teridentifikasi, hibridisasi somatik mampu memodifikasi dan memperbaiki sifat-sifat yang diturunkan secara poligenik (Millam *et al.* 1995, Purwito 1999).

Fusi protoplas dapat dilakukan dengan cara menggabungkan seluruh genom dari spesies yang sama (intra-spesies), atau antarspesies dari genus yang sama (inter-spesies), atau antargenus dari satu famili (inter-genus) (Wattimena 1999). Penggunaan fusi protoplas memungkinkan diperolehnya hibrida-hibrida dengan tingkat heterosigositas yang tinggi walaupun tingkat keberhasilannya sangat ditentukan oleh genotipenya (Mollers *et al.* 1992). Teknologi fusi protoplas juga dapat dilakukan untuk mendapatkan sifat-sifat tertentu seperti sifat ketahanan terhadap hama dan penyakit serta cekaman abiotik (Purwito 1999). Dengan demikian, tanaman hasil fusi dapat berupa tanaman dengan sifat-sifat gabungan dari kedua tetuanya termasuk sifat-sifat yang tidak diharapkan terutama berasal dari spesies liar. Oleh karena itu, untuk menghilangkan sifat-sifat yang tidak diinginkan tersebut maka perlu dilakukan silang balik (*back cross*) dengan tetua budi daya.

Kemajuan pesat dalam penelitian produksi hibrida somatik dan sibrida dalam transfer DNA tidak terlepas dari teknik isolasi, kultur dan regenerasi protoplas menjadi tanaman. Sejak pertama kali dilaporkan tentang regenerasi protoplas menjadi tanaman lengkap oleh Takeba *et al.* (1971), teknik isolasi, kultur hasil fusi, dan regenerasinya pada berbagai tanaman seperti tembakau, tomat, timun, kentang, slada, terung, dan nilam telah banyak diketahui (Bradsaw dan Mackey 1994). Banyak publikasi yang melaporkan bahwa keberhasilan kultur protoplas dan regenerasinya ditentukan oleh beberapa faktor, seperti genotipe dan jaringan yang digunakan, fisiologi jaringan, jenis dan konsentrasi enzim, masa inkubasi, media kultur, zat

pengatur tumbuh, dan kondisi inkubasi (Bradsaw dan Mackey 1994).

Pada tanaman padi telah dilaporkan keberhasilan regenerasi protoplas menjadi tanaman lengkap (Abdullah *et al.* 1986). Regenerasi tanaman hasil fusi protoplas inter-spesies antara padi budi daya subspecies Japonica dan beberapa species padi liar telah dilaporkan oleh Yan *et al.* (2004) dan Takamura *et al.* (1992).

Sebelum dilakukan fusi maka teknik isolasi protoplas harus dikuasai terlebih dahulu. Protoplas adalah sel telanjang tanpa dinding yang hanya dilindungi oleh membran plasma. Isolasi protoplas pertama kali dilakukan oleh Klercher pada tahun 1892. Protoplas dapat diisolasi dari hampir semua bagian tanaman, seperti akar, daun, nodul akar, koleoptil, kultur kalus dan daun *in vitro* (Husni *et al.* 2003). Isolasi protoplas pada umumnya dilakukan secara enzimatis. Jenis dan konsentrasi enzim sangat bervariasi seperti selulase R-10, pektirolase Y-23, pektinase, maserosim, dan hemiselulosa (Purwito 1999).

Fusi protoplas dapat dilakukan secara kimiawi dan fisik. Secara kimiawi, umumnya digunakan poli-eten glikol (PEG) yang pertama kali dilaporkan oleh Kao dan Michayluk (1975). PEG berfungsi sebagai *bulking agent*, yaitu sebagai jembatan antar protoplas yang mirip fungsinya dengan plasmodesmata. Terjadinya fusi semakin besar pada saat proses penghilangan PEG, yaitu pada saat pencucian. Dalam hal ini, keberhasilan fusi sangat dipengaruhi oleh konsentrasi PEG yang digunakan, masa inkubasi dalam larutan PEG, dan jumlah kerapatan protoplas yang akan difusikan. Keuntungan fusi protoplas dengan PEG antara lain dapat dilakukan dengan peralatan sederhana. Secara fisik, fusi dilakukan dengan menggunakan aliran listrik pada alat yang dilengkapi dengan generator AC dan DC. Generator AC berfungsi untuk membuat protoplas berjajar membentuk rantai lurus, selanjutnya pulsa DC pada tegangan tertentu dapat menginduksi terjadinya fusi karena pulsa DC dapat membuat celah yang dapat balik sehingga protoplas dapat berfusi (Zimmerman dan Scheurich 1981).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode isolasi, kultur dan fusi protoplas antara padi liar (*Oryza officinalis*) dan padi budi daya (*O. sativa* var. IR64).

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, BB-Biogen. Kegiatan ini mencakup dua kegiatan, yaitu

(1) isolasi dan kultur protoplas dan (2) studi fusi protoplas antara padi liar dengan budi daya.

Sumber Protoplas

Sumber protoplas yang digunakan adalah kalus embriogenik atau batang muda hasil perkecambahan secara *in vitro* dari padi varietas IR64 dan *O. officinalis* No. 105365. Untuk mendapatkan kalus yang akan digunakan sebagai sumber protoplas, embrio dari benih (yang telah diberi perlakuan pengeringan pada suhu 50°C selama dua hari) diisolasi dan ditanam pada media induksi kalus, yaitu MS + 0,4 mg/l BAP + 2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid + 3 g/l casein hydrolysate + 2% sukrosa. Sedangkan untuk mendapatkan sumber protoplas yang berasal dari jaringan muda, benih dikecambahkan pada media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh.

Isolasi dan Purifikasi Protoplas

Sebanyak $\pm 1-2$ g kalus *friable* dan jaringan daun muda yang telah diiris-iris (± 1 mm) masing-masing dimasukkan dalam cawan petri diameter 6 cm. Ke dalam cawan petri tersebut dimasukkan larutan enzim digesti. Untuk mendapatkan protoplas yang viabel dengan densitas tinggi (10^5-10^6 /ml) dilakukan beberapa perlakuan. Perlakuan pertama dilakukan terhadap komposisi larutan enzim yang digunakan, yaitu selulase 1, 2, dan 3% ditambah pektirolase 0,1%, maserozime 0,5% (w/v), driselase 0,5% (w/v), MES 5 mmol, dan manitol 13% yang dilarutkan dalam larutan CPW pada pH 5,6 (Yan *et al.* 2004). Inkubasi dilakukan selama 3 jam dalam keadaan gelap pada suhu ruang sambil digojok pada kecepatan 50 rpm. Setelah masa inkubasi dilakukan penyaringan dengan saringan nilon diameter 60 μ m. Hasil penyaringan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 10 menit pada suhu 22°C sampai terbentuk pelet protoplas. Supernatan dibuang sehingga hanya tinggal pelet saja. Pencucian dari sisa enzim dilakukan dengan meresuspensi pelet dengan larutan CPW + manitol 13%. Larutan suspensi protoplas kemudian disentrifugasi seperti tersebut di atas. Pencucian dilakukan sebanyak dua kali. Untuk mendapatkan protoplas yang murni dilakukan pengapungan protoplas menggunakan larutan sukrosa 21% atau 25% sehingga protoplas yang utuh dan viabel akan terapung di permukaan sedangkan protoplas yang rusak dan debris akan mengendap dalam larutan sukrosa. Protoplas murni dipisahkan secara hati-hati dengan menggunakan pipet pasteur, kemudian dilakukan pencucian dengan larutan pencuci CPW + manitol 13%.

Pengamatan dilakukan secara mikroskopis menggunakan mikroskop inverted (Olympus) terha-

dap jumlah protoplas yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan yang dicobakan. Jumlah protoplas dihitung menggunakan haemocytometer.

Kultur Protoplas

Hasil isolasi dari padi liar *O. officinalis* dan padi budi daya *O. sativa* (IR64) dikulturkan pada beberapa komposisi media. Sebanyak 0,2 ml larutan suspensi protoplas dengan densitas 1×10^6 per ml dikulturkan pada 2 ml media dalam cawan petri ukuran diameter 3 cm. Media yang dicoba untuk kultur protoplas adalah:

1. MS + manitol 0,4 mM + BA 2 mg/l + zeatin 0,1-1,0 mg/l + agarose 0,8 g/l
2. MS + manitol 0,4 mM + BA 2 mg/l + zeatin 0,1-1,0 mg/l + agarose 2 g/l
3. MS + glukosa 0,3% + sukrosa 4%
4. MS + glukosa 0,3% + sukrosa 4% + agar 2 g/l
5. N6 + glukosa 0,3% + sukrosa 4%
6. N6 + glukosa 0,3% + sukrosa 4% + agar 2 g/l
7. MS + sukrosa 1% + manitol 5 M + 2,4-D 0,5 mg/l + kinetin 0,3 mg/l
8. MS + sukrosa 1% + manitol 5 M + 2,4-D 0,5 mg/l + kinetin 0,3 mg/l + AgNO₃ 3 mg/l

Mikrokalus yang telah terbentuk kemudian dipindah ke dalam media dasar MS + 2,4-D 0,5 mg/l + BA 2 mg/l + zeatin 0,1 mg/l untuk menginduksi pembentukan kalus. Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan protoplas membentuk agregat sel atau mikrokalus secara visual.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sumber Protoplas

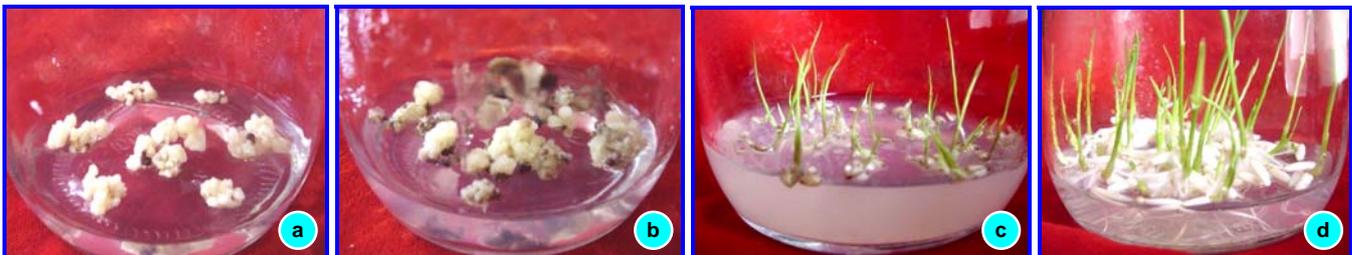
Kalus mulai terinduksi dari embrio padi setelah berumur 2-4 minggu setelah tanam. Pada tahap awal tidak semua embrio memberikan respon yang sama dalam membentuk kalus. Embrio padi liar mempunyai respon yang lebih rendah dibandingkan dengan embrio padi budi daya. Umumnya pembentukan kalus

dari padi liar lebih sukar dan memerlukan waktu (1-2 minggu) yang lebih lama dibandingkan padi budi daya. Kalus yang terbentuk bervariasi, baik struktur maupun warnanya. Warna coklat dan kehitaman sering mendominasi penampakan kalus yang terbentuk. Tahap awal pembentukan kalus dari embrio padi IR64 diperlukan waktu 6 minggu sedangkan untuk padi liar hingga 8 minggu sampai kalus tersebut dapat disubkultur pada media dengan komposisi yang sama. Setelah itu, subkultur kalus dengan warna dan tekstur yang baik dapat dilakukan setiap 2 minggu. Kalus yang digunakan untuk diisolasi protoplasnya adalah kalus embrionik yang berwarna putih atau putih kekuningan (Gambar 1a dan 1b). Yan *et al.* (2004) menyatakan bahwa kalus padi yang terbentuk pada tahap awal induksi tidak selalu menunjukkan kalus yang embrionik. Setelah melalui beberapa kali subkultur, kalus akan tampak membentuk *cluster* bulatan-bulatan kecil yang bersifat *friable*. Proses subkultur kalus harus dilakukan paling lama setiap 3-4 minggu, karena kalus yang terlalu lama disimpan akan menurunkan sifat embrionik dan akan berwarna coklat yang kemudian akhirnya akan mati.

Benih padi yang dikecambahkan secara *in vitro* mulai tumbuh pada umur 1-2 minggu. Permasalahan yang sering timbul dari perkecambahan adalah tingkat kontaminasi yang cukup tinggi. Daun yang berasal dari planlet/bibit yang terlalu tua akan sulit untuk diisolasi protoplasnya (Gambar 1c dan 1d).

Isolasi dan Purifikasi Protoplas

Hasil pengamatan dan penghitungan densitas protoplas setelah perendaman dalam beberapa komposisi enzim selama 4 jam dapat dilihat pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan bahwa penggunaan komposisi enzim yang sama terdapat variasi densitas protoplas yang dihasilkan, baik dilihat dari jenis tanaman padi maupun sumber protoplas yang digunakan. Pemakaian komposisi selulase 2% pada sumber protoplas dari daun maupun kalus dari jenis IR64 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap densitas protoplas



a = kalus *O. officinalis*, b = kalus IR64, c = planlet *O. officinalis*, d = planlet IR64.

Gambar 1. Bahan tanaman padi yang digunakan sebagai sumber untuk isolasi dan kultur protoplas.

Tabel 1. Kerapatan (densitas) protoplas padi IR64 dan *O. officinalis* dari jaringan daun dan kalus pada beberapa komposisi enzim.

Jenis padi	Sumber protoplas	Komposisi enzim		
		A	B	C
IR64 (<i>O. sativa</i>)	Daun	$1,12 \times 10^4$	$1,19 \times 10^6$	-
	Kalus	$2,83 \times 10^5$	$1,24 \times 10^6$	Pecah
Liar (<i>O. officinalis</i>)	Daun	0	Sedikit	-
	Kalus	$9,87 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	Pecah

A = selulase 1% RS (w/v), pektoliase 0,1% (w/v), maserozime 0,5% (w/v), driselase 0,5% (w/v);

B = selulase 2% RS (w/v), pektoliase 0,1% (w/v), maserozime 0,5% (w/v), driselase 0,5% (w/v);

C = selulase 3% RS (w/v), pektoliase 0,1% (w/v), maserozime 0,5% (w/v), driselase 0,5% (w/v).

yang dihasilkan. Penggunaan sumber protoplas yang berasal dari kalus menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan sumber yang berasal dari jaringan daun. Hal ini ditunjukkan dengan densitas protoplas yang lebih tinggi. Menurut Kim *et al.* (2005) dalam mengisolasi protoplas *Alstroemeria*, penggunaan kalus embrionik yang *friable* sebagai sumber protoplas hasilnya lebih efektif dibandingkan dengan yang berasal dari jaringan daun atau kalus yang kompak. Sel-sel dalam jaringan daun mempunyai kandungan pektin yang lebih tinggi dibandingkan dari sel-sel dari kalus (Babaoglu 2000).

Keberhasilan isolasi protoplas terutama tergantung pada kondisi jaringan dan kombinasi enzim yang digunakan. Tidak ada metode baku dalam isolasi dan kultur protoplas karena setiap individu sel atau jaringan yang akan digunakan sebagai sumber protoplas kemungkinan akan memerlukan kondisi yang khusus. Sebagai contoh kultur suspensi sel merupakan sumber yang paling mudah untuk diisolasi protoplasnya, demikian juga sel-sel dari jaringan mesofil lebih banyak digunakan dibandingkan sel-sel dari jaringan lain dalam tanaman (Gleddie 1995).

Dari konsentrasi enzim selulase yang dicoba terlihat bahwa protoplas dari jenis *O. sativa* lebih tinggi tingkat keberhasilan dan densitasnya dibandingkan dengan *O. officinalis*. Bahkan penggunaan selulase 1% pada sumber protoplas dari daun padi liar tidak menghasilkan protoplas, sedangkan penggunaan selulase 2% hanya menghasilkan protoplas dengan densitas yang sangat rendah. Mori *et al.* (1986) menggunakan komposisi enzim driselase 1%, selulase RS 2%, selulase R-10 2%, maserozime 2%, hemiselulosa 1%, dan pektoliase 0,1% untuk mengisolasi protoplas dari kalus empat spesies padi yang hasilnya menunjukkan bahwa keberhasilan protoplas padi budi daya untuk diisolasi lebih tinggi dibandingkan dengan padi liar.

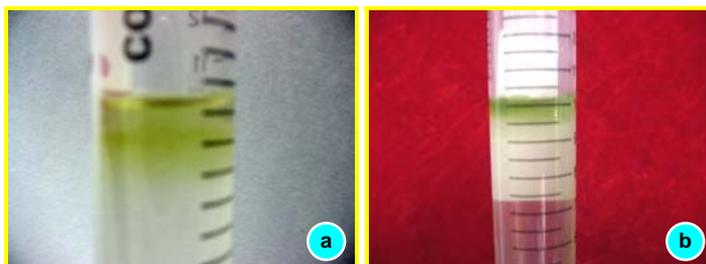
Mengingat keterbatasan sumber protoplas dari jaringan daun maka percobaan penggunaan konsentrasi selulase 3% hanya dicoba pada sumber protoplas dari kalus. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada konsentrasi selulase 3% protoplas cepat mengalami

proses plasmolisis sehingga sel-selnya pecah (*over digestion*).

Proses purifikasi dengan metode pengapungan menggunakan larutan sukrosa 25% menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan penggunaan sukrosa 21%. Hal ini dapat dilihat dari lapisan protoplas murni yang terpisah setelah proses sentrifugasi. Lapisan protoplas yang terbentuk pada larutan sukrosa 25% lebih tegas dibandingkan dengan sukrosa 21% (Gambar 2). Hasil pengamatan visual protoplas murni di bawah mikroskop dapat dilihat pada Gambar 3. Ukuran protoplas yang bersumber dari kalus *O. officinalis* umumnya relatif lebih kecil dibandingkan dengan protoplas IR64 yang bersumber dari jaringan daun muda.

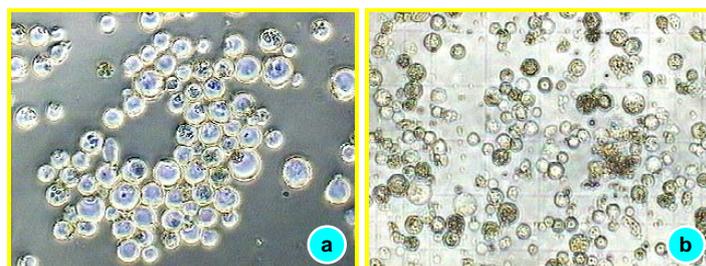
Kultur Protoplas

Hasil pengamatan terhadap perkembangan protoplas dalam media kultur protoplas yang dicoba dapat dilihat pada Tabel 2. Protoplas yang ditanam pada media dasar MS + manitol 0,4 mM + BA 2 mg/l + zeatin 0,1-1 mg/l + agarose 0,8 g/l (semi padat) atau 2 g/l (padat) menunjukkan bahwa kedua jenis protoplas masih utuh sampai hari ke-3, tetapi setelah itu pecah sedikit demi sedikit pada hari berikutnya hingga pada hari ke-7 semua protoplas pecah. Keadaan ini diduga oleh belum cocoknya komposisi media yang digunakan dan tekanan osmotik antara media dengan protoplas sehingga terjadi plasmolisis. Pada percobaan lain menggunakan komposisi media dasar MS dan N6 ditambah glukosa 0,3% dan sukrosa 4% dengan kondisi fisik padat dan cair. Hasil yang diperoleh dari percobaan ini setelah pengamatan umur satu minggu menunjukkan bahwa semua perlakuan yang diberikan masih belum memberikan respon terhadap pertumbuhan protoplas yang dikulturkan, baik untuk protoplas IR64 maupun padi liar. Percobaan lingkungan tumbuh yang cocok seperti konsentrasi osmotikum, yaitu glukosa 0,3% dan sukrosa 4% masih belum memberikan hasil yang baik. Protoplas masih pecah dan terkontaminasi. Selanjutnya, penanaman protoplas dilakukan pada media dasar MS dan N6 dalam bentuk cair dengan



a = 21% sukrosa, b = 25% sukrosa.

Gambar 2. Penampakan lapisan protoplas murni IR64 pada larutan pengapungan.



Gambar 3. Protoplas padi IR64 (a) dan *O. officinalis* (b) setelah proses pemurnian (Perbesaran 100x).

Tabel 2. Kondisi protoplas setelah ditanam selama 3-7 hari pada delapan komposisi media dengan tiga kondisi fisik yang berbeda.

Komposisi media	Fisik media	Kondisi protoplas
MS + manitol 0,4 mM + BA 2 mg/l + zeatin 0,1 mg/l + agarose 0,8 g/l	Semi padat	Protoplas utuh sampai dengan hari ke-3, setelah itu pecah sedikit demi sedikit, hingga hari ke-7 protoplas pecah semua.
MS + manitol 0,4 mM + BA 2 mg/l + zeatin 0,1 mg/l + agarose 2 g/l	Padat	Protoplas utuh sampai dengan hari ke-3, setelah itu pecah sedikit demi sedikit, hingga hari ke-7 protoplas pecah semua.
MS + glukosa 0,3% + sukrosa 4%	Cair	Protoplas bertahan sampai hari ke-7
MS + glukosa 0,3% + sukrosa 4% + agar 2 g/l	Padat	Protoplas bertahan sampai hari ke-7
N6 + glukosa 0,3% + sukrosa 4%	Cair	Protoplas bertahan sampai hari ke-7
N6 + glukosa 0,3% + sukrosa 4% + agar 2 g/l	Padat	Protoplas bertahan sampai hari ke-7
MS + sukrosa 1% + manitol 5 M + 2,4-D 0,5 mg/l + kinetin 0,3 mg/l	Cair	Protoplas bertahan sampai hari ke-7
MS + sukrosa 1% + manitol 5 M + 2,4-D 0,5 mg/l + kinetin 0,3 mg/l + AgNO ₃ 3 mg/l	Cair	Protoplas <i>O. officinalis</i> bertahan sampai hari ke-7. Protoplas IR64 memberikan respon pembelahan sel dan membentuk agregat sel dengan intensitas yang rendah.

penambahan sukrosa 1% dan manitol 0,5 M diperkaya dengan 2,4-D 0,5 mg/l dan kinetin 0,3 mg/l atau kinetin 0,3 mg/l dan AgNO₃ 3 mg/l. Percobaan ini dilakukan dengan mengadopsi metode yang dilakukan oleh Ishii (1988) dalam mempelajari viabilitas sel-sel pada kultur suspensi sel yang berasal dari protoplas padi. Menurut Ishii (1988) penambahan AgNO₃, berfungsi sebagai penghambat senyawa etilen, dapat meningkatkan jumlah koloni yang terbentuk dari kultur protoplas. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sampai minggu pertama setelah penanaman, baik protoplas padi liar maupun IR64 dapat bertahan hidup (tidak pecah) pada semua media yang dicoba. Pembentukan dinding sel diperkirakan terjadi pada hari ketiga setelah penanaman. Tetapi setelah minggu pertama, respon pembelahan sel terjadi hanya pada varietas IR64 yang di-

tanam pada media yang mengandung AgNO₃ dengan intensitas yang masih rendah (Gambar 4). Pemindahan agregat sel yang terbentuk pada media induksi kalus MS + 2,4-D 0,5 mg/l + BA 2 mg/l + zeatin 0,1 mg/l tidak memperoleh respon pembentukan kalus karena sel-sel umumnya pecah dan sebagian mengalami kontaminasi.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini telah diketahui metode isolasi dan pemurnian atau purifikasi protoplas padi budi daya var. IR64 dan padi liar (*O. officinalis*), yang masing-masing bersumber dari jaringan daun muda dan kalus embrionik *friable*. Dari beberapa perlakuan yang dicobakan protoplas padi liar dan IR64 dapat



a = protoplas IR64, b = proses pembelahan sel, c = pembentukan agregat sel IR64.

Gambar 4. Pembelahan sel asal protoplas dan pembentukan agregat sel IR64 pada media cair MS + kinetin 0,3 mg/l + AgNO₃ 3 mg/l + sukrosa 1% + manitol 0,5 M.

bertahan hidup sampai hari ketujuh pada media dasar MS dan N6 dengan penambahan 2,4-D 0,5 mg/l + kinetin 0,3 mg/l + sukrosa 1% + manitol 0,5 M. Respon pembelahan sel hingga menjadi agregat sel hanya terjadi pada kultivar IR64 yang ditanam pada media yang mengandung AgNO₃ 3 mg/l.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, R., E.C. Cocking, and A. Thompsom. 1986.** Efficient plant regeneration from rice protoplast through somatic embryogenesis. *Bio/Technology* 4:1087-1090.
- Babaoglu, M. 2000.** Protoplast isolation in Lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet): Determination of optimum explant sources and isolation conditions. *Turk J. Bot.* 24:177-185.
- Bradsaw, J.E. and G.R. Mackey. 1994.** Breeding strategies of clonally propagated potatoes. In Bradsaw, J.E. and G.R. Mackey (Eds.). *Potato Genetic*. CAB International Cambridge. 467-498 p.
- Gleddie, S.C. 1995.** Protoplast isolation and culture. In Gamborg, O.L. and G.C. Phillips (Eds.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture Fundamental Methods*. Springer. p. 167-180.
- Husni A., I. Mariska, G.A. Wattimena, dan A. Purwito. 2003.** Keragaan genetik tanaman terung hasil kultur protoplas. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 8(2):52-59.
- Ishii, S. 1988.** Factor influencing protoplast viability of suspension-cultured rice cells during isolation process. *Plant Physiol.* 88:26-29.
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk. 1975.** Nutrition requirements for growth of *Vicia hajastana* cell and protoplast at a very low population density in liquid media. *Planta* 125:105-110.
- Kim, J., J. Bergervoet, C. Raemakers, E. Jacobsen, and R. Visser. 2005.** Isolation of protoplasts, and culture and regeneration into plants in *Alstroemeria*. *In Vitro Cell. and Develop. Biol. Plant.* 41(4):505-510.
- Millam, S., L.A. Payne, and G.R. Mackay. 1995.** The integration of protoplast fusion, derived material into a potato breeding programme: A review of progress and problems. *Euphytica* 85:451-455.
- Mollers, C.S. Zhang, and G. Wenzil. 1992.** The influence of silver thiosulfate on potato protoplast culture. *Plant Breed.* 108:12-18.
- Mori, K.I., N. Oka, T. Kinoshita. 1986.** Isolation of protoplast from *Oryza sativa* L., and its wild relatives. In Oka, H.I. and G.S. Khush (Eds.). *Rice Genetics Newsletter*. Vol. 3. National Institute of Genetics, Misima, Japan.
- Purwito, A. 1999.** Fusi protoplas intra dan interspesies pada tanaman kentang. Disertasi Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Ramulu, K.S., P. Dijkhuis, E. Rutgers, J. Blaas, F.A. Krens, W.H.J. Verbeeh, C.M. Colijn. Hoonymans, and H.A. Verhoeven. 1996.** Intergenetic transfer of a partial genome and direct production of monosome addition plants by microprotoplast fusion. *Theor. Appli. Genet.* 92:316-325.
- Takamura, I., H. Fujii, A. Kotani, K. Mori, and T. Kinoshita. 1992.** RFLP analysis of rice somatic hybrids between *oryza sativa* cv. 'kitaake' and wild species (*O. punctata*, *O. minuta*, and *O. rufipogon*). *Plant Genome I Conference*. November. San Dirgo, CA.
- Takeba, I., G. Labib, and G. Melchers. 1971.** Regeneration of wheat plants from isolated mesophyll protoplast of tobacco. *Natur Wissenschaften* 58:318-320.
- Wattimena, G.A. 1999.** Application of biotechnology on horticultural crops production. Proceeding Seminar on Biotechnology: Application of Biotechnology on Horticultural Production. Bogor Agricultural University - DFID British Council. Bogor, April 14, 1999.
- Yan, C-q, K-x, Qian, G-p Xue, Z-c Wu, Y-l Chen, Q-s Qiu, X-q Zhang, and P Wu. 2004.** Production of bacterial blight resistant lines from somatic hybridization between *Oryza sativa* L. and *Oryza meyeriana* L.J. *Zhejiang Univ. SCI* 5(10):1199-1205.
- Zimmerman, U. and P. Scheurich. 1981.** High Frequency fusion of plant protoplast by electric field. *Planta* 151:26-32.