

TINJAUAN

Penggunaan Suspensi Sel dalam Kultur *In Vitro*

Sri Hutami

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

ABSTRACT

Utilization of Cell Suspension in *In Vitro* Culture. Sri Hutami. Cell suspension culture could be defined as a process that allows rapidly dividing homogenous suspension of cells to grow in liquid nutrient media. There are two main types of suspension cultures: (1) Batch cultures in which cells are nurtured in a fixed volume of medium until growth ceases and (2) Continuous cultures in which cell growth is maintained by continuous replenishment of sterile nutrient media. Plant cell suspension cultures are mostly used for the biochemical investigation of cell physiology, growth, metabolism, protoplast fusion, transformation and for large scale production of seed by bioreactor and production of secondary metabolites. Contamination is one of the largest problems when dealing with cell cultures. Differences between the products of cell suspension culture and whole plant are frequently observed. These phenomena's may be resulted from lack of differentiation and organization and cell culture-induced variation. Utilization of cell suspension culture in Indonesia is still limited, some of them for mass production of plantation seed with bioreactor system and for production of secondary metabolites. The success of this study give the opportunity for mass production of seeds from other plants and also production of secondary metabolites.

Key words: Cell suspension culture, seed production, secondary metabolites.

PENDAHULUAN

Berbagai spesies tanaman dapat diregenerasikan secara *in vitro* melalui berbagai cara tetapi semuanya memerlukan titik awal. Titik awal dapat berupa apapun baik sel tunggal, jaringan atau bagian organ, maupun potongan diferensiasi jaringan (atau organ) yang disebut eksplan (Pighin 2003). Kultur yang digunakan untuk tumbuhpun harus diperhatikan. Ada berbagai jenis kultur tanaman yang berguna untuk berbagai tujuan di antaranya kultur embrio, kultur organ, kultur kalus, dan kultur sel.

Dalam kultur sel, massa sel yang disebut kalus merupakan materi yang pertama dibutuhkan. Selanjutnya kalus disuspensikan dalam media cair yang mengandung berbagai nutrisi dan senyawa-senyawa yang dibutuhkan untuk pertumbuhan optimal yang menyebabkan sel menjadi tidak terdiferensiasi. Suspensi sel

tersebut selanjutnya diletakkan di atas *shaker* (mesin penggoyang/pemutar) yang menyebabkan agregat sel menjadi kumpulan sel-sel kecil dan sel tunggal yang tersebar merata dalam media cair. Sel-sel tersebut akan tumbuh terus sampai salah satu faktor menjadi pembatas menyebabkan pertumbuhan sel lambat. Sebelum hal tersebut terjadi, sel-sel dapat dipindahkan dalam media yang mengandung hormon yang dapat mengaktifkan pertumbuhan spesifik. Misalnya media yang mengandung auksin, dapat mengaktifkan pertumbuhan akar-akar adventif, sedangkan media yang mengandung sitokinin dapat memacu proliferasi tunas aksilar dan tunas adventif dan mengatur diferensiasi. Setelah tanaman berkembang sempurna, selanjutnya dapat dipindahkan ke tanah untuk tumbuh lebih lanjut. Gaile dan Wagner (1980 dalam George dan Sherrington 1984) melaporkan bahwa inisiasi kultur suspensi sel tidak selalu dimulai dari fase kalus tetapi juga potongan daun. Potongan daun *Chenopodium rubrum* (tanaman hias asal Amerika Utara) dalam larutan media MS dengan cahaya memperlihatkan pertumbuhan yang cepat dan pembelahan sel pada mesofil, dan setelah 4 hari diatas penggojok (*shaker*) terjadi desintegrasi sempurna, yaitu pelepasan sejumlah besar sel-sel ke dalam suspensi. Karena dinding-dinding sel tanaman mempunyai sifat kecenderungan secara alami melekat satu sama lain, maka sulit kemungkinannya untuk mendapatkan suspensi yang hanya mengandung sel-sel tunggal yang tersebar. Masalah tersebut dapat diatasi antara lain dengan menambahkan enzim pektinase dengan konsentrasi rendah untuk melepaskan sel sehingga terbentuk sel tunggal. Proporsi dan ukuran agregat sel bervariasi tergantung varietas tanaman dan media yang digunakan. Pertumbuhan sel dalam agregat cenderung lebih cepat dibandingkan dengan sel tunggal sehingga ukuran klaster sel meningkat selama fase pembelahan.

Ada beberapa metode kultur suspensi yang telah dikembangkan. George dan Sherrington (1984) menetapkan dua tipe utama kultur suspensi, yaitu:

1. *Batch cultures*, yaitu sel-sel ditumbuhkan dengan pemberian nutrisi dalam medium dengan volume tertentu sampai tumbuh.

2. *Continuous cultures*, yaitu sel ditumbuhkan dan dipelihara di dalam media nutrisi steril yang selalu di ganti-ganti.

Semua teknik kultur suspensi menggunakan beberapa metode penggocokan media kultur untuk memastikan terjadinya pembelahan sel dan pertukaran gas.

Batch cultures dimulai dengan inokulasi sel ke dalam media nutrisi dengan volume tertentu. Selama pertumbuhan jumlah sel akan meningkat sampai nutrisi di dalam media habis atau terjadi akumulasi zat penghambat. Volume yang biasa digunakan berkisar 100 ml dalam Erlenmeyer 1.000 ml. *Shaker* dioperasikan pada kecepatan 30-180 rpm dengan *orbital motion* sekitar 3 cm. Alternatif lain yang dapat dalam kultur ini, yaitu dengan sistem pemutaran.

Continuous cultures digunakan untuk memperoleh keseimbangan pertumbuhan, karena dalam *Batch cultures* sulit untuk mendapatkan tingkat produksi yang stabil dengan sel-sel baru yang mempunyai ukuran tetap dan komposisi yang seimbang. Untuk itu diperlukan subkultur secara periodik, terutama pada waktu populasi sel menjadi berlipat ganda. Keseimbangan pertumbuhan hanya diperoleh dengan menggunakan cara *continuous cultures* khususnya apabila sel-sel tanaman digunakan untuk produksi dalam skala besar untuk menghasilkan metabolit primer maupun sekunder. *Continuous cultures* pada dasarnya sama dengan pekerjaan bakteriologi.

Menurut Ammirato (1983) abscisic acid (ABA) pada konsentrasi yang tepat efektif untuk menormalkan perkembangan kultur suspensi sel pada semua sistem berdasarkan wadah/volume suspensinya (tabung reaksi pendek, tabung reaksi panjang, dan tabung erlenmeyer). Selain itu, ABA juga menghambat proliferasi abnormal yang memacu perkecambahan dan menormalkan pendewasaan. Apabila embrio gagal berkembang pada media tanpa suplemen, kombinasi zeatin dan ABA dapat memelihara pertumbuhan dan pendewasaan/pemasakan sel.

PENGGUNAAN KULTUR SUSPENSII SEL

Kultur suspensi sel tanaman pada umumnya digunakan untuk penelitian biokimia dari fisiologi sel, pertumbuhan, metabolisme, fusi protoplas, transformasi dan pada skala besar atau menengah digunakan untuk produksi metabolit sekunder. Untuk tujuan tersebut kultur suspensi ditumbuhkan dalam tabung erlenmeyer yang selalu digojok dengan mesin *shaker* dan disubkultur secara teratur dengan interval yang pendek (antara 1-2 minggu) (Schumacher *et al.* 1994).

Penggunaan Kultur Suspensi untuk Pertumbuhan Tanaman

Pertumbuhan dalam kultur suspensi sel lebih cepat daripada kultur kalus dan juga lebih mudah dikontrol dengan pergantian maupun penambahan media. Untuk tujuan mikropropagasi, multiplikasi akan lebih cepat terjadi dalam kultur suspensi. Ada 2 metode terjadinya multiplikasi dalam suspensi sel (George dan Sherrington 1984).

1. Pembentukan tanaman melalui embrio somatik di dalam kultur suspensi.
2. Pembentukan tanaman yang berasal dari sel tunggal dan/atau agregat sel dari suspensi yang selanjutnya diletakkan pada media padat dan tumbuh menjadi koloni kalus dan beregenerasi menjadi tanaman.

Hasil penelitian Salman (2002) menunjukkan bahwa kalus dan kultur suspensi sel diinisiasi dari potongan daun *Gypsophilla paniculata* (tanaman hias di daerah Eropa Timur). Pengukuran bobot segar dan bobot kering kalus menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus optimal pada media MS + 2,4-D 0,1 mg/l + BA 0,2 mg/l. Kultur kalus pada media ini meningkat dua kali lipat pada bobot segarnya dalam 4 minggu dari inokulasi. Kalus yang sudah membentuk bintik hijau disubkultur secara berulang pada media MS + 2,4-D dengan konsentrasi yang ditingkatkan untuk meningkatkan friabilitas. Kalus yang *friable* (remah) kemudian digunakan untuk membuat suspensi sel. Pertumbuhan maksimum dari kultur suspensi sel dicapai dengan menggunakan media yang sama untuk pertumbuhan kalus.

Pembentukan tunas adventif telah dilaporkan pada *Iris hollandica* Hort., yaitu tanaman bunga dari negeri Belanda (Fujino *et al.* 1972, Hussey 1976), *I. germanica* L. (Meyer *et al.* 1975) dan *I. ensanta* Thumb. (Yabuya *et al.* 1991) sedangkan embriogenesis somatik telah dilaporkan pada *I. pumila* L., *I. setosa* Pall. (Radjevic *et al.* 1987). Shimazu *et al.* (1997) melaporkan bahwa pada induksi dan proliferasi dari kalus embriogenik *I. germanica* L., kultivar 'G1', 'Adorn' dan 'Rococo' diperoleh dengan mengkulturkan eksplan daun pada media Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan 2,4-D 1 mg/l, kinetin 1 mg/l, kasein hidrolisat 200 mg/l, prolin 250 g/l, sukrosa 30 mg/l, dan gellan gum 2,5 g/l. Di antara kultivar-kultivar tersebut hanya 'G1' yang dapat dikulturkan pada suspensi media N6 dengan 2,4-D 1 mg/l, kinetin 1 mg/l, kasein hidrolisat 200 mg/l, prolin 250 g/l, sukrosa 30 mg/l. Media MS dengan asam gibberelat 1 mg/l (GA₃), sukrosa 30 mg/l, dan gellan gum 2,5 g/l cocok untuk pembentukan embrio somatik dari suspensi sel. Bila embrio

somatik dipindah ke media MS padat tanpa zat pengatur tumbuh dan disubkultur tiap bulan, diperoleh 36 tunas dari 20 mg suspensi sel.

Suatu protokol regenerasi tanaman tetraploid *tall fescue*, yaitu tanaman jenis rumput yang banyak dijumpai di dataran rendah yang lembab dan panas yang biasanya merupakan padang rumput untuk ternak di Eropa, Afrika Utara, dan Amerika Utara (*Festuca arundinacea* v. *glaucescens* $2n = 4x = 28$) telah dibuat oleh Fournier *et al.* (1996). Kalus diinduksi dari bagian basal daun muda dan digunakan untuk inisiasi kultur suspensi. Diperoleh pertumbuhan yang cepat dalam kultur suspensi sel dan bila ditanam pada media agar padat, kalus akan berkembang membentuk tunas dan akhirnya menjadi tanaman sempurna.

Xiao *et al.* (1997) melaporkan penelitiannya mengenai induksi kalus friabel dari potongan akar bayam (*Spinacia oleracea* L.) dengan zat pengatur tumbuh konsentrasi tinggi (IAA 48,52 μM dan asam giberelat 10 μM) disuspensikan dalam media cair. Ukuran fraksi sel antara 100-200 μM digunakan untuk menetapkan kultur suspensi. Tunas adventif dan akar diperoleh dari suspensi ($3,2 \times 10^5$ sel per ml) dengan diikuti prosedur subkultur pada dua atau tiga media yang berbeda. Pada kedua prosedur, komposisi media kultur kedua konsentrasi zat pengatur tumbuh merupakan kunci keberhasilan organogenesis pada suspensi. Perpanjangan dan perakaran dilakukan pada media yang berbeda. Planlet diaklimatisasi di tanah kemudian tumbuh dan berkembang secara normal sampai berbunga dan memproduksi biji. Berbagai media cair yang digunakan untuk inisiasi dan subkultur suspensi sel dari bayam disajikan pada Tabel 1.

Data dari Tabel 1 menunjukkan bahwa walaupun tanpa zat pengatur tumbuh IAA dan kinetin suspensi sel dapat terbentuk dengan baik. Tampaknya asam

amino glutamin dan biotin sangat berpengaruh terhadap pembentukan dan pertumbuhan suspensi sel.

Tang *et al.* (2001) mengembangkan suatu prosedur yang cepat dan efisien untuk pembuatan kultur suspensi sel embriogenik 2 varietas komersial padi *Japonica chinese* (Yonghua 8 dan Eryi 105). Kultur suspensi sel embriogenik 2 varietas tersebut dibuat dari 0,5-1,0 g bobot basah kalus embriogenik dalam media inisiasi kalus AA (Muller dan Grafe 1978) selama 2,5 bulan dari biji-biji steril. Isolasi protoplas dilakukan pada saat suspensi sel berumur 18 bulan setelah inisiasi dengan efisiensi mencapai 0,15-0,37%. Regenerasi tanaman dari protoplas mencapai 14-26%. Perbandingan 2 prosedur untuk inisiasi dan kultur suspensi sel embriogenik 2 varietas padi Yonghua 8 dan Eryi 105 disajikan pada Tabel 2.

Dengan prosedur yang dimodifikasi terlihat lebih efisien karena tidak perlu subkultur, waktu untuk produksi suspensi lebih cepat, yaitu 1,5 bulan, serta waktu yang dibutuhkan dari inisiasi kalus sampai suspensi lebih cepat, yaitu 2,5 bulan dibandingkan prosedur standar 6-11 bulan.

Peningkatan sistem regenerasi dari kultur suspensi sel beberapa kultivar padi indica telah diteliti pada akhir-akhir ini oleh Wagiran *et al.* (2008). Hasil penelitian menunjukkan bahwa induksi kalus bervariasi tergantung pada genotipe. *Nipponbare*, *Hayahishiki* dan 5 varietas *Fujisaka* menunjukkan hasil induksi kalus berturut-turut sebesar 100, 93, dan 53% pada media LS yang dikombinasikan dengan 2,4-D setelah 4 minggu dalam kultur. Proliferasi kalus diamati pada pembentukan *scutellum* yang berwarna kekuningan. Kultur suspensi sel diinisiasi dari kalus yang berumur 4 minggu dalam media cair N6 yang mengandung 2,4-D 3 mg/l dan kinetin 1 mg/l selama sebulan dengan subkultur secara rutin. Hasil penelitian menunjukkan bah-

Tabel 1. Media cair yang digunakan untuk inisiasi dan subkultur suspensi sel dari bayam.

Kode media	Zat pengatur tumbuh (μM)		
	IAA	Kinetin	
M1 ⁽¹⁾	5,71	2,32	
M2 ⁽¹⁾	M2a	14,27	0,00
	M2b	28,54	0,00
M3 ⁽²⁾	M3a	0,00	0,00
	M3b	0,00	0,46
	M3c	28,54	2,32
	M3d	48,53	0,00

Semua media menggunakan media dasar MS (Dalton dan Street 1976) + GA₃ 1 μM + sukrosa 2% + myo-inositol 100 mg/l dan ⁽¹⁾ = glutamin 200 mg/l + biotin 5,0 mg/l, ⁽²⁾ = glutamin 100 mg/l + biotin 5,0 mg/l.

Sumber: Xiao *et al.* (1997).

Tabel 2. Perbandingan dua prosedur untuk inisiasi dan kultur suspensi sel embriogenik dua varietas padi Yonghua 8 dan Eryi 105.

	Prosedur standar (Abdullah <i>et al.</i> (1986))	Prosedur yang dimodifikasi
Media inisiasi kalus	LS 2,5 (media LS + 2,4-D/media AA 2,5 mg/l)	LS 2,5
Eksplan untuk inisiasi kalus	Biji masak	Biji masak
Waktu untuk produksi kalus-Em	3-4 minggu	3-4 minggu
Subkultur untuk kalus-Em pada media semi solid LS2.5 sebelum inisiasi	2-3 bulan dengan subkultur bulanan	tidak perlu
Kuantitas kalus-Em yang dibutuhkan untuk inisiasi suspensi	1,0-2,0 g	0,5-1,0 g
Media kultur cair untuk inisiasi	AA2 (media LS + 2,0 mg/l 2,4-D)	AA2
Media/volume tabung erlenmeyer untuk inisiasi suspensi	10-20 ml dalam 100 ml tabung erlenmeyer	6 ml AA2 dalam 25 ml tabung erlenmeyer
Waktu untuk membuat suspension Em setelah mentransfer kalus ke media AA2	3-7 bulan	1,5 bulan
Subkultur setelah membuat suspensi-Em	1 ml pcv + 6 ml medium AA + 21 ml medium AA2 dalam 100 ml tabung erlenmeyer setiap 7 hari	Sama
Waktu yang dibutuhkan dari inisiasi kalus sampai suspensi Em	6-11 bulan	2,5 bulan

Kalus-Em = embriogenik kalus, suspensi-Em = suspensi embriogenik, pcv = *pack cell volume*.

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

wa regenerasi tunas tertinggi dihasilkan dari *Nipponbare* (60%), sedangkan *Hayahishiki* sebesar 30% dan *Fujisaka* sebesar 20% ketika dikulturkan pada media dasar MS yang mengandung kinetin 3 mg/l dan NAA 0,5 mg/l. Setelah 6 minggu kalus tertutup oleh tunas hijau yang tumbuh dan berkembang dengan rata-rata tunas per kalus sejumlah 3-8.

Penggunaan Kultur Suspensi untuk Fusi Protoplas

Singh *et al.* (1997) berhasil meregenerasikan tanaman barley (*Hordeum vulgare* cv. Schooner) melalui suspensi sel dan kultur protoplas. Kalus embriogenik diperoleh dari embrio muda yang digunakan untuk membuat kultur suspensi. Lebih dari 100 tanaman dengan berbagai variasi biji diregenerasikan menjadi 6 kultur suspensi sel embriogenik. Protoplas diisolasi dari 3 kultur suspensi. Ketika proto-kalus embriogenik dipindahkan ke media regenerasi dihasilkan tunas hijau dan tunas albino. Selanjutnya tunas hijau ditransfer ke media tanpa zat pengatur tumbuh. Planlet yang sudah mempunyai sistem perakaran kuat kemudian diaklimatisasi di rumah kaca. Hasil analisis ujung akar dari tanaman yang diregenerasikan dari kultur sel ternyata mempunyai komposisi $2n = 14$ kromosom seperti yang diharapkan. Sebaliknya analisis kromosom akar tanaman yang berasal dari kultur protoplas menunjukkan hasil yang bervariasi. Karim dan Adachi (1997) berhasil meregenerasikan bawang merah (*Allium cepa* L.) melalui kultur suspensi, isolasi dan kultur protoplas. Tanaman *pear millet* juga telah berhasil diregenerasikan dari protoplas yang diisolasi dari kultur suspensi sel (Vasil 1979 dalam George dan Sherrington 1984). Haploid sel suspensi protoplas padi juga digunakan oleh Chair *et al.* (1996) dalam membandingkan aktivitas 3 *cereal gene-derived promoter-gus fusions* dan efisiensi seleksi oleh 3 gen seleksi yang berbeda dalam suatu sistem transformasi *polyethylene glycol*.

Penggunaan Kultur Suspensi untuk Transformasi

Kemampuan berbagai jenis tanaman untuk beregenerasi dari kultur jaringan sangat menentukan keberhasilan penggunaan teknik bioteknologi seperti rekayasa genetik (Petitprez *et al.* 2005). Shimazu *et al.* (1997) mengatakan bahwa kultur suspensi sel memegang peranan penting dalam makropropagasi dan pemuliaan dengan menggunakan teknik bioteknologi pada *Iris*. Faktor kritis yang menentukan suksesnya kultur suspensi embriogenik sel adalah identifikasi awal dan *selective enrichment* dari pembentukan struktur embriogenik (Spangenberg *et al.* 1995). Penetapan kultur suspensi embriogenik sel yang menyebabkan regenerasi tanaman pertama kali dikembangkan pada *Festuca urundinacea* (salah satu jenis rumput di Jerman) oleh Dalton (1988). Pada penelitian ini suspensi sel-sel embriogenik diinisiasi dari 30 embrio zigotik masak yang dikulturkan pada media cair MS + sukrosa 30% + 2,4-D 10 mg/l. Dari 1 kultivar embrio yang digunakan sebagai eksplan untuk inisiasi, menjadi populasi campuran embrio zigotik, ternyata diperoleh berbagai genotipe sel dalam suspensi. Kultur suspensi sel tersebut mampu beregenerasi membentuk tunas hijau ketika dipindahkan pada media morfogenesis, tetapi kemampuan regenerasinya menurun dengan waktu (Dalton 1988, Dalton *et al.* 1998). Altpeter dan Posselt (1999) mengembangkan perbaikan protokol suspensi sel untuk *perennial ryegrass* (rumput-rumputan) dengan hasil regenerasi sel yang tinggi untuk berbagai genotipe yang dilengkapi dengan dasar-dasar yang bagus untuk penelitian transformasi. Penggantian sukrosa dengan maltosa, dicamba dengan 2,4-D dan peningkatan pemberian BAP secara bertahap pada media kultur inisiasi, meningkatkan frekuensi regenerasi secara nyata dari suspensi sel. Hutami (2000) melaporkan bahwa penggunaan BAP (6-benzylamino-purine) 0,1 mg/l dapat memacu pertum-

buhan bintik hijau dari kalus pada suspensi sel rumput *Lolium perenne* L. Karena suspensi sel lebih disukai untuk target transfer gen pada *perennial ryegrass* maka perbaikan protokol dari Altpeter dan Posselt (1999) mempunyai potensi untuk meningkatkan frekuensi transformasi dan pengembangan teknologi untuk rekalsitrasi kultivar atau genotipe.

Pada transformasi padi biasanya digunakan embrio muda atau kalus sebagai eksplan. Hoa dan Bong (2002) menggunakan suspensi sel embriogenik padi indica sebagai materi awal pada transformasi dengan menggunakan *Agrobacterium* dengan gen *pmi* (suatu gen dari *Escherichia coli*) pengkode *phosphomannose isomerase* sebagai marka seleksi. Dengan sistem *phosphomannose isomerase* akan diperoleh sel transgenik yang dapat menggunakan manosa sebagai sumber karbohidrat yang terdapat dalam medium. Dengan sistem ini tanaman transgenik dapat dikembangkan dari 2 komersial padi indica (cv Mot Bui dan MTL 250) yang tumbuh di delta Mekong. Tanaman transgenik yang diperoleh fertil dan mempunyai fenotipe normal.

McElroy *et al.* (1990) juga menggunakan kultur suspensi sel padi (*Oryza sativa* cv Lemon) diregenerasikan dari kalus yang dikulturkan pada media cair R₂ mengandung sukrosa 3%, 2,4-D 2 mg/l, dan vitamin B5 2 mg/l dengan subkultur tiap minggu yang diinkubasi pada ruang gelap pada suhu 26°C. Suspensi sel kemudian disaring melalui mesh 700 µm sebelum ditembak dengan partikel *bombardment* berupa tungsten 1,2 µm partikel yang dicampur dalam larutan DNA 10 µg plasmid. Aktivitas sel dan perkembangan kalus diamati dengan penampakan bintik biru 2 dan 10 hari setelah penembakan diikuti dengan prosedur uji *Gus*.

Fauquet *et al.* (1995) mengatakan bahwa beberapa tipe jaringan sebagai eksplan seperti embrio muda, kalus embriogenik, suspensi embriogenik telah dicoba dan beberapa tanaman transgenik telah diproduksi melalui *microbombardment*. Kalus embriogenik lebih disukai, tapi dalam beberapa hal suspensi embriogenik lebih menguntungkan. Transformasi padi indica menggunakan suspensi embriogenik dan metode biolistik sering dilakukan pada beberapa varietas yang sulit diregenerasikan seperti IR72, IR64, dan BG90-2 dengan efisiensi rendah (1-5%). Tanaman transgenik stabil sampai 7 generasi keturunannya.

Vasil *et al.* (1991) mendapatkan kalus transformasi yang stabil melalui penembakan DNA pada kultur suspensi sel gandum (*Triticum aestivum* L.) menggunakan *microprojectile bombardment* dengan kecepatan tinggi. Tiga reporter atau marka gen, bergabung atau terpisah dalam plasmid yang dikenal sebagai: *neomycin phospho-transferase* (NPTII), *β-glucuronidase*

(*Gus*) dan *5-enolpyruvylshikimate phosphate (EPSP) synthase*.

Penggunaan Kultur Suspensi untuk Produksi Metabolit Sekunder

Menurut Pighin (2003) beberapa metabolit sekunder seperti aroma rasa, pemanis alami, industri makanan ternak, pafum dan insektisida komersial tidak berfungsi fisiologis secara vital seperti asam-asam amino atau asam nukleat, tetapi zat-zat metabolit tersebut diproduksi untuk melawan predator potensial, menarik serangga penyerbuk atau menyembuhkan infeksi penyakit (Chalwa 2000 dalam Pighin 2003). Metabolit lain yang berguna dan diproduksi oleh tanaman adalah shikonin, zat kimia yang digunakan untuk pewarna dan untuk bidang farmasi. Kultur suspensi sel tanaman sangat berguna untuk mempelajari biosintesis dari metabolit sekunder. Walaupun ada keterbatasan dalam sistem kultur sel dalam produksi metabolit sekunder, cara ini lebih disukai daripada perbanyakan tanaman secara konvensional. Hal tersebut disebabkan karena kemampuannya memproduksi senyawa yang berguna di bawah kondisi yang terkontrol sehingga teknik ini dapat digunakan untuk menghasilkan senyawa kimia yang sedang dibutuhkan oleh pasar. Selain itu ada sel-sel khusus yang dapat diperbanyak untuk menghasilkan senyawa metabolit tertentu yang tidak dapat diproduksi melalui perbanyakan tanaman secara konvensional.

Produksi antifungal Spirostanol Saponin (SC-1) telah dideteksi dalam kultur suspensi sel *Solanum chrysostrichum* spesies terong dari Mexico (Villarreal *et al.* 1997). *Batch cultures* dari suspensi sel dibuat dari kalus yang berasal dari hipokotil yang ditumbuhkan selama 25 hari dalam tabung erlenmeyer yang digojlok yang berisi media MS. Pengaruh dari ukuran inokulum dan konsentrasi sukrosa dalam akumulasi biomasa dan sintesis metabolit aktif telah diteliti. Produksi maksimum SC-1 lebih dari 14 mg/g (50 kali lipat dari tanaman yang tumbuh di lapang) diperoleh setelah 20 hari dengan menggunakan 2% inokulum dan media MS yang ditambah dengan 2,4-D 2 mg/l, kinetin 2 mg/l, dan sukrosa 30-45 g/l.

Abdullah *et al.* (1998) membuat kultur suspensi sel mengkudu (*Morinda elliptica*) untuk memproduksi *anthraquinone*. Media dasar MS + NAA 0,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l dengan konsentrasi sukrosa 8% merupakan media terbaik untuk pertumbuhan sel dan produksi *anthraquinone*. Strategi yang digunakan adalah dengan memanipulasi umur kultur dan umur inokulum, formulasi media, temperatur, dan intensitas cahaya. Dengan menggunakan kultur yang berumur 18 bulan, dan inokulum berumur 7 hari yang diinkubasi pada

suhu $27 \pm 3^\circ\text{C}$, *anthraquinone* yang dihasilkan adalah 2,9 g/l di bawah cahaya 1.200 lux dan 4,5 g/l pada kondisi gelap.

Akita *et al.* (2002) melaporkan bahwa revisi/modifikasi media LS (Linsmaier-Skoog) terhadap produksi betasianin diteliti pada kultur suspensi *Beta vulgaris* L. Komposisi media yang dapat memproduksi betasianin tinggi diperoleh dengan mengurangi konsentrasi nitrogen anorganik (30 mM), perbandingan amonium terhadap nitrat (1 : 14), penurunan konsentrasi Zinc (0,0003 mM), tanpa Fe dan Co. Modifikasi media LS mampu menghasilkan betasianin maksimum, yaitu 550 mg/l yang dicapai pada lama kultur 14 hari. Media tersebut memacu produksi betasianin dalam tiga tipe lini sel yang berbeda. Produktivitas betasianin (40 mg/l) lebih tinggi dari hasil penelitian yang telah dilaporkan sebelumnya.

Edahiro dan Seki (2006) menunjukkan adanya korelasi konsentrasi antosianin dengan ukuran agregat kultur sel stroberi lini FAR (*Fragaria ananassa* R) yang memproduksi antosianin dan penilpropanoid lain dalam keadaan tanpa cahaya. Oleh karena itu, pengontrolan ukuran agregat sel sangat diperlukan untuk meningkatkan produktivitas produk atau metabolit yang berguna melalui kultur suspensi sel.

PENYIMPANAN KULTUR SUSPENSII

Penyimpanan jangka panjang dari kultur suspensi sel biasa dilakukan dalam kriopreservasi (Withers 1991). Untuk proses penyimpanan, beberapa strategi telah dikembangkan yang semuanya bertujuan untuk mengurangi biaya tenaga dan pemeliharaan. Meskipun demikian diperlukan alat-alat mahal khusus yang tidak dapat digunakan untuk pekerjaan rutin (Schumacher *et al.* 1994). Ada beberapa contoh prosedur untuk mempertahankan kultur suspensi sel tanaman dalam medium. Dengan metode ini, kultur suspensi *Agrostis tenuis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana chinensis*, *Oryza sativa*, dan *Solanum marginatum*, dapat dipertahankan hidup pada suhu rendah sampai lebih dari 4 bulan tanpa pemindahan ke media baru. Kultur suspensi disimpan tanpa penggojokan pada suhu 10°C di ruang gelap atau dengan sinar redup sekitar 50 lux dalam botol plastik yang ditutup dengan membran yang dapat melewatkan udara steril dengan mudah (Schumacher dan Malik 1992, Schumacher *et al.* 1994). Beberapa bahan adsorpsi yang efektif atau stabilizer seperti arang aktif, gelatin, asam glutamat, pati, gula dan lain-lain juga dapat ditambahkan ke dalam suspensi sel. Penambahan 0,01% arang aktif + 1,0% gelatin kedalam kultur suspensi *N. tabacum* dapat meningkatkan kemampuan hidup sel dibandingkan dengan kontrol.

MASALAH DALAM KULTUR SUSPENSII SEL

Kontaminasi merupakan problem terbesar dalam kultur sel. Dalam kultur suspensi, mikroorganisme dapat tumbuh lebih cepat dan mengambil semua nutrisi sehingga menghambat jaringan tanaman untuk tumbuh. Menurut Pighin (2003) ada beberapa cara untuk meminimalkan kemungkinan kontaminasi, yaitu:

- Penggunaan otoklap untuk semua media dan alat-alat sebelum digunakan dengan suhu 121°C selama 15-20 menit dan tekanan 20 psi.
- Penggunaan *laminar air flow* dalam proses pembuatan kultur sel.
- Penyimpanan kultur sel dalam ruang khusus yang jarang digunakan.
- Penggunaan desinfektan dalam ruangan.
- Bila masih terkontaminasi, penggunaan antibiotik dapat dilakukan dan senyawa anti-mitotik untuk melawan jamur.

Selain kontaminasi, sering juga terjadi perbedaan produk akhir antara kultur suspensi sel atau kalus dengan hasil keseluruhan tanamannya (Anonim 1998). Hal tersebut disebabkan karena:

1. Kurangnya diferensiasi dan organisasi

Diferensiasi morfologi dan selular diperlukan untuk ekspresi hasil metabolit sekunder beberapa tanaman (Collin dan Watts 1984). Kurangnya diferensiasi morfologi pada sel-sel kalus menghambat pembentukan hasil metabolit tersebut. Kultur dari sumber aroma rasa, seperti lemon, pir, apokat, dan menta tidak dapat memproduksi minyak esensial karena sel-selnya kekurangan jaringan khusus yang diperlukan untuk mensintesis dan mengakumulasi senyawa tersebut (Carew *et al.* 1965 dalam Anonim 1998). Kurangnya diferensiasi dalam sel-sel kalus mengganggu lintasan metabolit secara normal yang mengakibatkan akumulasi prekursor senyawa yang diinginkan.

2. Kultur sel menyebabkan induksi variasi

Induksi variasi karena kultur suspensi sel kemungkinan juga merupakan salah satu penyebab perbedaan produk akhir (dan tingkat keracunan) yang sering terlihat di antara kultur suspensi sel yang diinisiasi dari jenis sel yang sama. Variabilitas yang besar di antara klon-klon dalam sifat-sifat pertumbuhan dan produksi metabolit sekundernya sering diamati pada kultur suspensi kalus dan sel (Selby dan Collin 1976, Hall dan Yeoman 1987). Variasi ini kemungkinan berasal dari heterogenitas bagian tanaman yang dikulturkan, atau proses dalam kultur sel sendiri yang menyebabkan terjadinya perubahan. Kultur suspensi sel secara normal terdiri atas

sel-sel dengan morfologi dan fase agregasi yang berbeda. Secara individu sel-sel pada fase fisiologis mempunyai respon yang berbeda terhadap lingkungan. Perbedaan dalam distribusi sel-sel tersebut di antara kelompok sel (*cell clone*) seringkali menyebabkan variabilitas dalam produksi metabolit sekunder (Hall dan Yeoman 1987). Kultur sel juga dapat menginduksi variasi secara genetik maupun epigenetik (Larkin dan Scowcroft 1981). Perubahan dalam jumlah dan penyusunan kembali kromosom, amplifikasi dan delesi DNA, dan aktivitas transposon telah diamati dalam kultur suspensi.

PENGGUNAAN KULTUR SUSPENSİ SEL DI INDONESIA

Sampai saat ini penggunaan teknik kultur suspensi sel di Indonesia masih relatif sedikit. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh pekerjaannya yang cukup rumit dan perlu ketelitian yang sangat tinggi terutama menjaga sterilitas kultur agar tidak terjadi kontaminasi. Di samping itu, dalam produksi bibit secara masal diperlukan alat-alat yang cukup mahal seperti *shaker* dan bioreaktor yang besar. Masalah lain yang mungkin timbul dan perlu diperhatikan adalah sumber dan jenis eksplan, macam media, jenis dan konsentrasi hormon. Selain itu faktor pengendali kultur dengan bejana bioreaktor seperti pH meter, kadar oksigen terlarut, dan kecepatan agitasi juga perlu dioptimalkan (Anonim 2007a). Namun demikian, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia telah memanfaatkan teknik ini dengan menggunakan sel tanaman teh sebagai sumber bibit. Prosedur kultur sel sampai pembentukan bibit teh dimulai dari induksi kalus remah, pembuatan suspensi sel dan kultur sel embriogenik, kultur agregat sel untuk induksi embrio somatik, pendewasaan embrio somatik, perkecambahan embrio somatik dan seleksi bibit, serta pengembangannya (Anonim 2007b). Perbanyak bibit tanaman perkebunan pada media padat telah berhasil dilakukan, namun daya regenerasi embrio, tingkat keseragaman, dan jumlah planlet atau bibit yang dihasilkan masih perlu ditingkatkan. Metode kultur cair khususnya sistem bioreaktor, membuka peluang untuk mendapatkan bibit unggul secara masal dengan tingkat keseragaman yang lebih tinggi (Anonim 2007b). Di institusi tersebut induksi embrio somatik tanaman kelapa sawit dengan sistem bioreaktor juga telah berhasil dikembangkan. Keberhasilan tersebut membuka peluang untuk menginduksi embrio somatik tanaman perkebunan lainnya (Anonim 2007b).

Selain untuk produksi bibit tanaman secara masal, kultur suspensi sel di Indonesia juga digunakan

untuk produksi metabolit sekunder. Marwani (2008) telah mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa verbaskosida (suatu senyawa antitumor) dari kultur jati (*Tectona grandis*). Kultur kalus diperoleh pada medium MS yang mengandung 3% sukrosa, gelatamgum 0,2%, NAA 5% μM , dan BA 0,1% μM . Pola produksi verbaskosida dipelajari dalam kultur suspensi sel. Kultur suspensi sel diperoleh pada medium yang sama dengan untuk kultur kalus kecuali kandungan NAA yang diturunkan menjadi 0,1 μM . Pola produksi verbaskosida dalam kultur suspensi sel *T. Grandis* terlihat mengikuti pola pertumbuhan sel dan mencapai maksimum pada hari ke-14, setelah itu menurun dengan tajam. Syahrani *et al.* (2005) telah berhasil memproduksi glikosida salisilamida dari salisilamida dan salisin dari salisil alkohol dengan menggunakan kultur suspensi sel *Solanum mammosum*. Dengan kultur suspensi sel *S. laciniatum*, salisil alkohol dibiotransformasi menjadi iso salisin. Asam o- dan p-amino benzoat oleh kultur suspensi sel *S. mammosum* dibiotransformasi menjadi glikosida dan glikosil esternya. Hidrokuinon dibiotransformasi menjadi senyawa monoglikosidanya (arbutin). Martin (2006) menggunakan metode imobilisasi sel untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dalam kultur *in vitro*. Dengan menggunakan suspensi sel *Catharanthus roseus* L. (G.) Don. imobilisasi sel diteliti pengaruhnya terhadap produksi ajmalisin (obat antikanker). Kultur suspensi sel yang dimobilisasi menghasilkan kandungan ajmalisin tertinggi pada suspensi sel sebesar 32,13 $\mu\text{g/g}$ BK pada hari ke-21. Rata-rata kandungan ajmalisin pada suspensi sel yang diimobilisasi meningkat 122% dibandingkan dengan kontrol.

KESIMPULAN

Berbagai spesies tanaman dapat diregenerasikan secara *in vitro* melalui kultur suspensi sel, yaitu suatu proses yang menyebabkan sel membelah secara cepat dan tumbuh dalam media nutrisi cair yang homogen.

Ada dua metode kultur suspensi, yaitu *Batch cultures* di mana sel-sel ditumbuhkan dengan pemberian nutrisi dalam medium dengan volume tertentu sampai tumbuh dan *Continuous cultures*, yaitu sel ditumbuhkan dan dipelihara di dalam media nutrisi steril yang selalu diganti-ganti.

Penggunaan kultur suspensi antara lain untuk penelitian biokimia dari fisiologi sel, pertumbuhan, metabolisme, fusi protoplas, transformasi, dan pada skala besar digunakan untuk produksi metabolit sekunder dan perbanyak tanaman.

Masalah terbesar dalam kultur sel adalah kontaminasi, namun dengan beberapa cara masalah ter-

sebut dapat diatasi. Masalah lain yang juga dapat terjadi adalah terjadinya perbedaan produk akhir kultur suspensi sel atau kalus dengan hasil keseluruhan tanaman.

Penggunaan teknik kultur suspensi sel di Indonesia masih relatif sedikit di antaranya untuk produksi bibit beberapa tanaman perkebunan dengan sistem bioreaktor dan untuk produksi metabolit sekunder. Keberhasilan tersebut membuka peluang untuk produksi bibit tanaman lain secara masal dan memproduksi berbagai senyawa metabolit sekunder.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A., A.M. Ali, M. Marzia, N.H. Lazis, and A.B. Ariff. 1998.** Establishment of cell suspension cultures of *Morinda elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 54:173-182.
- Abdullah, R., E.C. Cocking, and J.A. Thompson. 1986.** Efficient plant regeneration from rice protoplast through somatic embryogenesis. *Bio/Technol.* 4:1087-1090.
- Akita, T., Y. Hina, and T. Nishi. 2002.** New medium composition for high betacyanin production by a cell suspension culture of table beet (*Beta vulgaris* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(4):902-905.
- Altpeter, F. and U.K. Posselt. 1999.** Improved plant regeneration from cell suspensions of commercial cultivars, breeding-and inbred lines of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *J. Plant Physiol.* 156:790-796.
- Ammirato, P.V. 1983.** The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: Suspension culture techniques and hormone requirements. *Bio/Technol.* 1:66-73.
- Anonim. 1998.** Why are The products of cell suspension cultures different?. *CHEMTECH* January 1998. The American Chemical Society 28(1):40-46.
- Anonim. 2007a.** Penyediaan bibit unggul tanaman perkebunan melalui produksi embrio somatik dengan sistem bioreaktor. *Warta Plasma Nutfah Indonesia* 19:3-4.
- Anonim. 2007b.** Sel tanaman teh sebagai sumber bibit. *Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian.* 29(3):14-15.
- Chair, H., T. Legavre, and E. Guiderdoni. 1996.** Transformation of haploid, microspore-derived cell suspension protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Rep.* 15(10):766-770.
- Collin, H.A. and M. Watts. 1984.** Handbook of Plant Cell Culture. In Evans, D.A., W.R. Sharp, P.V. Ammirato, and Y. Yamada (Eds.). Macmillan Publishing. New York. Vol. 1 Chapter 24.
- Dalton, S.J. 1988.** Plant regeneration from cell suspension protoplasts of *Festuca arundinacea* Schreb (tall fescue) and *Lolium perenne* L. (perennial ryegrass). *J. Plant Physiol.* 132:170-175.
- Dalton, C.C. and H.E. Street. 1976.** The role of the gas phase in the greening and growth of illuminated cell suspension culture of spinach (*Spenacea oleracea* L.). *InVitro* 12:485-494.
- Dalton, S.J., A.J.E. Bettany, E. Timems, and P. Morris. 1998.** Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated transformation of cell suspension cultures. *Plant Sci.* 132:31-43.
- Edahiro, J.I. and M. Seki. 2006.** Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *J. Biosci. Bioengineer.* 102(1):8-13.
- Fauquet, C.M., S. Zhang, L. Chen, P. Marmey, A. de Kochko, and R.N. Beachy. 1995.** Biolistic transformation of rice: Now efficient and routine for japonica and indica rices. *Rice Genetics III. Proceedings of The Third International Rice Genetics Symposium.* Manila, Philippines 16-20 October 1995. p. 153-163.
- Fournier, D., M. Ghesquiere, and C. Poisson. 1996.** Plant regeneration from cell suspension cultures of tetraploid tall fescue. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 46:165-168.
- Fujino, M., T. Fujishima, and K. Hanada. 1972.** Multiplication of Dutch iris (*Iris holandica*) by organ culture. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 41:66-71.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984.** Plant Propagation by Tissue Culture. Hand Book and Directory of Comercial Laboratories. Eastern Press, Reading, Berks. England. p. 2-502.
- Gould, A.R. 1986.** Factors controlling generation of variability *in vitro*. In Vasil (Ed.). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.* Academic Press. New York. Vol. 3. Chapter 29.
- Hall, R.D. and M.M. Yeoman. 1987.** Intercellular and intercultural heterogenety in secondary metabolit accumulation in cultures of *Catharanthus roseus* following cell line selection. *J. Exp. Bot.* 38:1391-1398.
- Hoa, T.T.C. and B.B. Bong. 2002.** *Agrobacterium-mediated* transformation of rice embryogenic suspension cells using phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as a selectable marker. *Omonrice* 10:1-5.
- Hussey, G. 1976.** Propagation of Dutch iris by tissue culture. *Sci. Hort.* 4:163-165.
- Hutami, S. 2000.** Cell suspension culture of *Lolium perenne* L. Report of Training Program at Institute for Plant Genetic and Crop Plant Research (IPK) Gatersleben, Germany. 10 p.
- Karim, M.A. and T. Adachi. 1997.** Cell suspension, isolation and culture of protoplast of *Allium cepa*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 51:43-47.

- Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft. 1981.** Somaclonal variant, a novel source of variability from cell culture improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-214.
- Martin, A.F. 2006.** Pengaruh amobilisasi sel terhadap pola pertumbuhan sel dan produksi ajmalisin pada kultur suspensi sel *Catharanthus roseus* L. (G.) Don. Undergraduate Thesis dari JBPTITBBI/2006-11-29 14:46:40. <http://digilib.bi.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbbi-gdl-si-2004-andrifadil-1608&node=1589&star.1/1/2008>.
- Marwani, E. 2008.** Identifikasi dan produksi verbaskosida dalam kultur jaringan *Tectona grandis*. Prosiding Seminar Nasional Biologi XVI:56-60.
- McElroy, D.W. Zhang, J. Cao, and R. Wu. 1990.** Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation. *The Plant Cell.* 2:163-171.
- Meyer Jr., M.M., L.H. Fuchigami, and A.N. Roberts. 1975.** Propagation of tall bearded irises by tissue culture. *Hort. Sci.* 10:479-480.
- Muller, A.J. and R. Grafe. 1978.** Isolation and characterisation of *Nicotiana Tabacum* lacking nitrate reductase. *Molec. Gen. Genet.* 161:67-76.
- Petitprez, M., A. Sarrafi, E.F. Berrios, X. Xuhan, C. Briere, and Gentzbittel. 2005.** Somatic embryogenesis by liquid culture of epidermal layers in sunflower: From genetic control to cell development. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 81:331-337.
- Pighin, J. 2003.** Your guide to plant cell culture. *The Science Creative Quartely.* 3p. <http://www.scq.ubc.cq/?p=523>.
- Radjevic, L.J.O. Sokic, and B. Tucic. 1987.** Somatic embryogenesis in tissue culture of iris (*I. pumilla* L.). *Acta Hort.* 2:719-723.
- Salman, M.N. 2002.** Establishment of callus and cell suspension cultures from *Gypsophilla paniculata* leaf segments and study of the attachment of host cells by *Eerwinia herbicola* pv. *Gypsophillae*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 69(2):189-196.
- Schumacher, H.M. and K.A. Malik. 1992.** Aconvenient method to maintain plant cell cultures for medium terms. Poster: P2-R7-01. Abstract. *In Proceedings of Seventh International Congress for Culture Collections.* Beijing, China. p. 116.
- Schumacher, H.M. and K.A. Malik. 1994.** Aconvenient method to maintain plant cell cultures for medium terms. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultures in Liquid Media.* p. 143-145.
- Schumacher, H.M., K.A. Malik, and F.V. Iren. 1994.** Simple storage of plant cell cultures in liquid media. Technical Information Sheet No. 13. UNESCO/WFCC-Education Committee. 5 p.
- Selby, C. and H.A. Collin. 1976.** Clonal variation in growth and flavour production in tissue cultures of *Allium cepa* L. *Annals Bot.* 40:911-918.
- Shimazu, K., H. Nagaike, T. Yabuya, and T. Adachi. 1997.** Plant regeneration from suspension culture of *Iris germanica*. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 50:27-31.
- Singh, R.R., J.A. Kemp, J.F. Kollmorgen, J.A. Qureshi, and G.B. Fincher. 1997.** Fertile plant regeneration from cell suspension and protoplast culture of barley (*Hordeum vulgare* cv. Schooner). *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 49:121-127.
- Spangenberg, G.Z., Z.Y. Wang, X. Wu, J. Nagel, and I. Potrykus. 1995.** Transgenic perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) plants from microprojectile bombardment of embryogenic suspension cells. *Plant Sci.* 108:209-217.
- Syahrani, A., G. Indrayanto, Sutardjati, and A. Wilkins. 2005.** Biotransformasi salisilamida dengan kultur suspensi sel *Solanum mammosum*. Software dari GDLHUB/2005-11-11 18:23:15. <http://www.adln.lib.unair.ac.id/go.php?id=gdlhub-gdl-sw-2005-syahraniac-148&PHPSESSI.1/1/2008>
- Tang, K., X. Sun, D. An, J.B. Power, E.C. Cocking, and M.R. Davey. 2001.** A simple and rapid procedure to establish embryogenic cell suspensions as a source of protoplasts for efficient plant regeneration from two chinese commercial rice cultivars. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 66:149-153.
- Vasil, V., S.M. Brown, D. Re, M.E. Fromm, and I.K. Vasil. 1991.** Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technol.* 9:743.
- Villarreal, M.L., C. Arias, A.F. Velasco, O.T. Ramirez, and R. Quintero. 1997.** Cell suspension culture of *Solanum chrysotrichum* (Schldl.). A plant producing an antifungal spirostanol saponin. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 50:39-44.
- Wagiran, A., I. Ismail, C.R.C.M. Zain, and R. Abdullah. 2008.** Improvement of plant regeneration from embryogenic suspension cell culture of japonica rice. *J. Biol. Sci.* 8(3):570-576.
- Withers, L.A. 1991.** Maintenance of plant tissue cultures. *In* Kirsop, B.E. and A. Doyle (Eds.). *Maintenance of Microorganisms and Cell Cultures.* Academic Press. London. p. 243-267
- Xiao, X.G., G. Charles, and M. Branchard. 1997.** Plant regeneration from cell suspensions of spinach. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 49:89-92.
- Yabuya, T., Y. Ikeda, and Adachi T. 1991.** *In vitro* propagation of Japanese garden iris. *Iris ensanta* Thumb. *Euphytica* 57:77-81.