Studi Regenerasi dan Produksi Protoplas Mesofil Daun Beberapa Klon Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

Study of Regeneration and Production of Leaves Mesophyle Protoplasts of Several Potato Cultivars

Asnawati[1], G.A. Wattimena[1], M. Machmud[2], Agus Purwito[1]

ABSTRACT

The objectives of these experiments were to obtain medium composition to enlarge leaf size for protoplast production and to obtain medium composition for plant regeneration. The result showed that the best medium to produce the larger leaves was medium MS with double concentration of macronutrients without hormone supplemented with Morel vitamins, 3% (w/v) sucrose and 7 g/l agar. This medium produced leaves with diameter of 1.44 cm comparing to control medium MS with 0.67 cm in diameter. Medium MS containing 0.1 mg/l IAA, 0.5 mg/l Zeatin and 0.5 mg/l GA_3 was able to regenerate vigorous shoots of 7 clones. Protoplast isolation of 5 clones using enzyme composition containing 0.5 % cellulase Onozuka RS, 0.05 %, pectolyase Y-23, 0.05 % MES, 9.1 % mannitol and pH 5.5, without CPW medium produced protoplast with variable yield from 10.50 x 10^5 protoplast/g leaves for Atlantic to 46.58 x 10^5 protoplast/g for BF15.

Keyword : Leaves size, Plant regeneration, Potato, Protoplast

PENDAHULUAN

Kentang merupakan tanaman sayuran dan pangan yang populer karena mempunyai rasa yang enak, nutrisi berimbang, harganya cukup tinggi, umbi relatif tidak mudah rusak dan fluktuasi harga rendah. Selain itu kentang juga merupakan bahan baku penting pada industri *french fries*, *chip* dan lain-lain. Namun demikian tanaman kentang juga dikenal sebagai tanaman yang sangat rentan terhadap hama, penyakit dan cekaman lingkungan lainnya (Purwito et al., 2002). Untuk mengatasi hal tersebut sering dilakukan manipulasi genetik, baik dengan menginduksi terjadinya variasi somaklonal atau dengan mengintroduksi gen-gen tertentu, seperti gen ketahanan terhadap penyakit.

Kultur protoplas merupakan metode yang menginduksi munculnya variasi dari dalam tanaman itu sendiri, dengan memacu terekspresinya sifat-sifat genetik yang biasanya tertutupi atau tidak muncul pada fenotipenya. Teknik ini berkembang dari prinsip totipotensi sel, dimana setiap sel mempunyai kemampuan untuk tumbuh dan berkembang pada lingkungan yang sesuai dengan membawa karakter masing-masing yang independen. Dengan mengisolasi setiap sel dari tanaman dan meregenerasikannya pada media yang sesuai, maka akan didapatkan tanaman baru yang membawa karakter masing-masing sel tersebut.

Untuk mengintroduksi gen-gen tertentu dari suatu tanaman ke tanaman lainnya dapat dilakukan dengan metode fusi protoplas. Fusi protoplas mempunyai kemampuan yang tinggi untuk merakit kultivar-kultivar baru karena dapat mengatasi ketidakmampuan dari hibridisasi seksual maupun transformasi genetik tanaman (Purwito, 1999). Selain dapat mentransfer gen-gen yang belum teridentifikasi, fusi protoplas juga dapat digunakan untuk memodifikasi dan memperbaiki sifat-sifat yang diturunkan secara poligenik. (Miliam *et al.*, 1995). Tujuan utama fusi protoplas pada tanaman kentang (*S. tuberosum*) adalah untuk (1) mengintrogresi sifat-sifat ketahanan dari species atau genus *Solanum* lain dan (2) meresintesis tingkat tetraploid untuk memaksimalkan heterosigositas (Purwito, 1999).

Mesofil daun tanaman yang dikulturkan *in vitro* paling banyak digunakan sebagai sumber protoplas pada *Solanaceae* (Menke *et al.*, 1996). Hal ini karena kondisi fisiologis dari daun tanaman dari kultur *in vitro* lebih konstan dibanding daun tanaman dari rumah kaca. Selain keseragaman daun *in vitro* lebih tinggi dan dapat tersedia setiap saat serta tidak perlu melakukan sterilisasi. Kelemahan pada daun *in vitro* kentang

1) Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Budidaya Pertanian, dan Laboratorium Seluler dan Molekuler Tanaman Pusat Penelitian Bioteknologi, Kampus IPB, Darmaga, Bogor,
2) Balitbio, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor.

adalah ukurannya yang kecil, sehingga menyulitkan dalam proses isolasi, selain produksi protoplas yang dihasilkan sangat rendah bahkan sering tidak diperoleh protoplas (Purwito, 1999). Diperlukan cara mempersiapkan donor eksplan yang baik, yaitu tanaman yang vigor dan mempunyai ukuran daun yang lebar sehingga mudah dalam pengerjaannya. Selain itu juga perlu dipelajari teknik isolasi yang tepat dan media kultur yang sesuai untuk menumbuhkan protoplas menjadi tanaman.

Regenerasi merupakan salah satu komponen dalam manipulasi genetik secara *in vitro*. Untuk mendapatkan tanaman hasil rekayasa genetik diperlukan suatu sistem regenerasi yang berhasil meregenerasikan bagian tanaman menjadi tanaman baru. Sistem regenerasi umumnya terkait dengan komposisi media dasar serta jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh. Pada umumnya penelitian regenerasi yang berhasil pada tanaman kentang menggunakan dua tahap media, yaitu tahap induksi kalus yang menggunakan auksin dan zeatin atau zeatin ribosida serta media tahap kedua untuk meregenerasikan tunas dengan menggunakan sitokinin selain zeatin (De Block, 1988; Yadaf dan Sticklen, 1995).

Dalam percobaan ini dilakukan manipulasi media tumbuh untuk memperbaiki pertumbuhan tanaman *in vitro* beberapa klon kentang terutama dalam hal ukuran daun, dengan mengambil model dari species liar *S. chacoense*. Selain itu juga dilakukan percobaan meregenerasikan mesofil daun yang akan digunakan sebagai material sumber protoplas pada beberapa media regenerasi dengan menggunakan 3 jenis sitokinin yaitu Zeatin, 2ip (2-isopentenyl), dan BAP (Benzyl Amino Purine) yang dikombinasikan dengan auksin IAA (Indol Acetid Acid) dan NAA (Napthalene Acetid Acid) serta Giberelin yaitu GA_3. Selanjutnya juga dilakukan penghitungan produksi protoplas dari klon-klon tersebut yang diisolasi dalam larutan enzim 0.5 % selullase RS dan 0.05 % pektoliase Y-23 yang dilengkapi dengan 0.5 M manitol, 0.05 % buffer MES pada pH 5.5

BAHAN DAN METODE

Sumber tanaman yang digunakan adalah 7 klon kentang koleksi Prof. Dr. G.A Wattimena (Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Tanaman Pusat Penelitian Bioteknologi IPB) yang berasal dari Laboratorie Morphogenese Vegetable Experimentale, Universitas Paris Sud XI, Prancis dan bank plasma nutfah kentang, Madison, USA.

Optimasi Media Tumbuh In vitro Kentang

Percobaan disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap dengan faktor tunggal, yaitu 4 jenis media (M1 = MS + Vitamin Morel + 30 g/l gula pasir + 7 g/l agar; M2 = MS + 2x Vitamin Morel + 30 g/l sukrosa + 7 g/l agar; M3 = MS 2x Makro + Vitamin Morel + 30 g/l gula pasir + 7 g/l agar; M4 = MS 2x makro + Vit Morel + 30 g/l sukrosa + 7 g/l agar)

Eksplan yang ditanam adalah tunas samping satu buku per eksplan dan 5 eksplan per botol. Tanaman diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu 20-23° C dengan foto periode 16-24 jam per hari. Pengamatan dilakukan setelah tanaman berumur 4 minggu. Peubah yang diamati meliputi : (a) tinggi tanaman (b) jumlah tunas (c) jumlah daun dan (d) lebar daun. Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan analisis ragam dan jika terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan.

Studi Regenerasi Mesofil Daun In vitro Kentang

Percobaan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dua faktor, yaitu faktor klon yang terdiri dari 7 klon serta konsentrasi dan jenis zat pengatur tumbuh (10 macam). Terdapat 70 kombinasi perlakuan, dan tiap perlakuan diulang 6 kali. Masing-masing satuan percobaan terdiri atas satu botol kultur yang berisi 5 eksplan. Klon-klon yang digunakan adalah Atlantic, BF15, Nicola, Aminca, Cardinal dan species liarnya *S. phureja* dan *S. chacoense* PI 175415-3. Konsentrasi dan jenis zat pengatur yang digunakan adalah M1= 0.1 mg/l IAA + 2 mg/l BAP; M2 = 0.1 mg/l IAA + 3 mg/l BAP; M3 = 0.5 mg/l IAA + 3 mg/l BAP + 1 mg/l GA_3; M4 = 2 mg/l IAA + 3 mg/l BAP + 1 mg/l GA_3; M5 = 0.01 mg/l NAA + 2 mg/l 2 ip; M6 = 0.5 mg/l NAA + 3 mg/l 2 ip + 1 mg/l GA_3; M7 = 2 mg/l NAA + 3 mg/l 2 ip + 1 mg/l GA_3; M8 = 0.5 mg/l IAA + 3 mg/l 2 ip + 1 mg/l GA_3; M9 = 0.1 mg/l IAA + 2 mg/l Zeatin; M10 = 0.1 mg/l IAA + 0.5 mg/l zeatin + 0.5 mg/l GA_3.

Media dasar yang digunakan adalah media MS ditambah vitamin Morel, 20 g/l sukrosa, 200 mg/l kasein hydrolisat dan 8 g/l bacto agar dan pH 5.6 - 5.8. ZPT disterilkan dengan mikro filter berukuran 0.20 μm dan ditambahkan sesuai perlakuan setelah media diotoklaf. Eksplan diambil dari daun kedua sampai kelima tanaman *in vitro* berumur ± 4 minggu yang diperbanyak pada media terbaik dari percobaan sebelumnya, dan dilakukan sub kultur setiap 3-4 minggu sekali. Pengamatan dilakukan setiap minggu mulai minggu pertama setelah penanaman. Peubah yang diamati ialah (a) persentase eksplan berkalus (b) persentase eksplan bertunas dan (c) Persentase eksplan berakar, selain itu juga diamati warna kalus dan kualitas tunas. Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan analisis ragam dan jika terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan.

Isolasi Protoplas

Percobaan dilakukan mengikuti metode Sihachakr *et al* (1988), dimana permukaan daun bagian bawah

digores dengan scalpel tajam kemudian direndam dalam larutan enzim dan diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 27° C tanpa cahaya. Selanjutnya Protoplas disaring dan diendapkan dengan mensentrifugasi 100x g selama 5 menit. Supernatan dibuang sedangkan debris dicuci dengan larutan pencuci (0.5 M manitol dan 0.5 mM $CaCl_2$) kemudian dimurnikan dengan menambahkan 0.6 M larutan sukrosa pada endapan dan disentrifugasi 100x g selama 10 menit, lalu dicuci lagi dengan larutan pencuci. Selanjutnya dilakukan penghitungan protoplas menggunakan haemositometer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Media Tumbuh In vitro Kentang

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan media tidak berpengaruh nyata terhadap tinggi tunas namun berpengaruh sangat nyata terhadap jumlah cabang, jumlah daun dan diameter daun. Peningkatan konsentrasi media dasar dan penggunaan sukrosa dapat memperbaiki pertumbuhan tanaman dengan meningkatkan ukuran dan jumlah daun. Diameter daun *in vitro* meningkat dengan meningkatnya konsentrasi unsur makro atau dengan meningkatkan konsentrasi vitamin. Demikian pula dengan penggunaan sukrosa ternyata juga relatif lebih baik dibanding gula pasir biasa. Media dengan konsentrasi unsur makro yang ditingkatkan dua kali ditambah sukrosa 30 gr/l menghasilkan diameter daun yang terbaik dalam percobaan ini yaitu 1.44 cm dan pada media dengan konsentrasi vitamin ditingkatkan menjadi dua kali diameter daun rata-rata 1.32 cm (Tabel 1)

Diameter daun pada media dua kali konsentrasi makro dikombinasikan dengan gula pasir biasa ialah 1.29 cm. Hal ini disebabkan perbedaan tingkat kemurnian antara gula pasir biasa (konsumsi) dengan sukrosa ialah tingkat kontaminasi dari bahan-bahan kimia selama proses pengolahan seperti Pb, SO_4, SO_2 dan zat-zat lainnya tidak lebih dari 0.0001%. Penelitian Gautheret (1959) *dalam* George dan Sherrington (1984) membandingkan berbagai jenis gula pada kultur jaringan wortel, menemukan bahwa sukrosa merupakan karbohidrat yang paling baik kemudian glukosa, maltosa dan rafinosa. Fruktosa dan galaktosa kurang efektif, sedangkan manosa dan laktosa merupakan karbohidrat yang paling tidak efektif. Pada dasarnya urutan ini berlaku umum untuk semua tanaman, walaupun kekecualian (George dan Sherrington, 1984).

Tabel 1. Pengaruh komposisi media terhadap pertumbuhan tanaman *in vitro* kentang umur 4 minggu

Komposisi Media	Tinggi (cm)	Jumlah cabang	Jumlah daun	ϕ daun (cm)
MS + Vit Morel + 30 g/l gula	6.46 a	1.83 ab	8.66 b	0.67 b
MS + 2x Vit Morel + 30 g/l sukrosa	6.69 a	1.37 b	11.86 a	1.32 a
MS 2x makro + Vit Morel + 30 g/l gula	6.50 a	2.00 a	12.65 a	1.29 a
MS 2x makro + Vit Morel + 30 g/l sukrosa	6.71 a	2.33 a	12.84 a	1.44 a
	tn	**	**	**

tn = tidak nyata; ** = sangat nyata

Kemampuan Regenerasi

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tunas terbentuk pada semua klon pada sebagian besar perlakuan. Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa klon, jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan berpengaruh sangat nyata terhadap persentase pembentukan tunas. Interaksi antara keduanya memberikan pengaruh yang sangat nyata (Tabel 2).

Inisiasi tunas umumnya dimulai dari 2 MST sampai 12 MST. Sub kultur yang dilakukan pada semua eksplan sangat membantu inisiasi tunas dari kalus karena dapat membantu menghilangkan fenolik yang terbentuk pada kalus klon-klon yang sulit beregenerasi seperti Cardinal, Atlantic, dan Aminca. Kalus yang tampak segar, berwarna putih kehijau-hijauan atau hijau segar pada umumnya dapat beregenerasi menjadi tunas lebih cepat dibanding yang berwarna kuning atau kuning kecoklatan. Morfogenesis eksplan tergantung pada keseimbangan auksin dan sitokinin di dalam media. Interaksi antara ZPT endogen tanaman dan ZPT eksogen yang diserap dalam media akan menentukan arah perkembangan eksplan. *S. chacoense* PI175415 pada media M5, M9 dan M10 mampu meregenerasikan tunas paling banyak (> 14 tunas per eksplan).

Tabel 2. Persentase tunas yang terbentuk dari mesofil daun kentang pada 12 MST

Media	Atlantic	BF15	Nicola	Aminca	Cardinal	*S. phureja*	*S. chacoense*
M1	57.63 c-g	28.95 gh	100.00 a	0.00 i	0.00 i	50.00 d-g	74.84 b-e
M2	50.00 d-g	50.00 d-g	100.00 a	0.00 i	0.00 i	0.00 i	83.25 bc
M3	39.35 f-h	50.00 d-g	100.00 a	50.00 d-g	74.84 b-e	100.00 a	100.00 a
M4	39.35 f-h	57.63 c-g	78.17 b-d	45.73 e-g	0.00 i	53.94 d-g	100.00 a
M5	0.00 i	14.07 h	74.78 b-e	0.00 i	0.00 i	0.00 i	93.13 ab
M6	46.64 e-g	100.00 a	0.00 i	31.85 gh	0.00 i	74.84 b-e	100.00 a
M7	0.00 i	98.56 a	0.00 i	0.00 i	50.00 d-g	0.00 i	100.00 a
M8	64.45 c-f	0.00 i	78.84 b-e	32.60 f-h	54.36 d-g	0.00 i	100.00 a
M9	100.00 a	0.00 i	100.00 a	74.84 b-e	90.78 ab	0.00 i	100.00 a
M10	74.84 b-e	50.00 d-g	100.00 a	50.00 d-g	100.00 a	100.00 a	100.00 a

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama dan angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji Duncan 5%; Untuk uji beda data ditransformasi dengan Arc.sin $\sqrt{x}$;

Pengaruh jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan tunas adalah khas untuk setiap klon. Dari 10 kombinasi jenis dan konsentrasi ZPT yang digunakan, semuanya mampu membentuk tunas walaupun tidak pada semua klon. Kemampuan eksplan membentuk tunas pada media dengan penambahan ZPT tergantung pada genotipa dan kandungan hormon endogen eksplan (George dan Sherrington, 1984; Pierik, 1987).

Eksplan daun pada beberapa klon tampaknya tetap memerlukan sitokinin zeatin. Hal ini diindikasikan bahwa dari 10 kombinasi media yang digunakan hanya media M10 (0.1 mg/l IAA + 0.5 mg/l zeatin + 0.5 mg/l GA_3) yang mampu meregenerasikan tunas yang vigor pada semua klon yang digunakan. Media M10 rata-rata mampu meregenerasikan 5,6 tunas per eksplan, sedangkan media M3 (0.5 mg/l IAA + 3 mg/l BAP + 1 mg/l GA_3) juga mampu meregenerasikan tunas pada semua klon (4,8 tunas), namun tunas yang dihasilkan kurang vigor pada sebagian klon. Pertambahan tunas yang cukup besar dengan lamanya eksplan dalam media regenerasi terjadi pada *S. chacoense* dan Nicola mulai minggu ke 4 sampai minggu ke 12.

Produksi Protoplas

Keberhasilan isolasi protoplas sangat ditentukan oleh jenis dan konsentrasi enzim yang digunakan serta lamanya waktu inkubasi. Waktu inkubasi yang terlalu lama (>20 jam) akan menyebabkan banyak protoplas pecah pada saat dilakukan pencucian dan pemurnian. Komposisi enzim 0.5 % selulase Onozuka RS dan 0.05 % pektoliase Y-23, dapat menghasilkan protoplas dari mesofil daun *in vitro* beberapa tanaman kentang dengan hasil yang bervariasi.

Tabel 3. Produksi protoplas klon kentang setelah diinkubasi selama 16 jam

Klon Kentang	Jumlah protoplas/ gr daun ($x10^5$)
Atlantic	10.50 ± 7.81
BF15	37.65 ± 6.96
Nicola	24.10 ± 11.07
Cardinal	14.47 ± 6.55
S. chacoense PI175415(3)	46.58 ± 5.46

Atlantic merupakan klon yang pertumbuhannya vigor, berwarna hijau tua dan daunnya relatif tebal dibandingkan klon-klon lainnya. Dari hasil percobaan media regenerasi, klon ini termasuk eksplan yang banyak mengandung fenolik, sehingga produksi protoplasnya relatif sedikit. Hampir sama dengan Atlantic, Cardinal juga cukup banyak senyawa fenoliknya dan warna daunnya hijau muda seperti juga Nicola. Kondisi-kondisi yang terkait dengan tanaman asal sumber protoplas inilah yang diduga menyebabkan bervariasinya produksi protoplas yang dihasilkan. Purwito (1999) mengatakan bahwa tanaman yang daya tumbuhnya cepat dan diameter daun lebar pada media perbanyakan akan menghasilkan protoplas yang lebih banyak dibandingkan tanaman yang daya tumbuhnya lemah.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Media MS dengan dua kali konsentrasi unsur makro yang dikombinasikan dengan sukrosa menghasilkan tanaman *in vitro* yang vigor dan diameter daun terlebar (ϕ 1.44 cm).
2. Kemampuan eksplan mesofil daun dalam menginisiasi tunas tergantung dari interaksi antara jenis dan konsentarasi zat pengatur tumbuh yang diberikan dengan klon yang digunakan. Namun secara umum media M10 (0.1 mg/l IAA + 0.5 mg/l zeatin + 0.5 mg/l GA3) merupakan media yang terbaik untuk meregenerasikan tunas yang vigor pada semua klon dengan jumlah yang berbeda.
3. Larutan enzim dengan komposisi 0.5 % selulase Onozuka RS dan 0.05 % pektoliase, 0.05 % MES, 9.1 % manitol pada pH 5.5 – 5.6 dapat mengisolasi protoplas dengan jumlah yang bervariasi antar klon, yaitu yang tertinggi 46.58 x 10^5 protoplas/g daun pada BF15 dan paling sedikit 10.50 x 10^5 protoplas/g daun pada Atlantic.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini adalah salah satu penelitian yang dibiayai oleh Riset Unggulan Terpadu (RUT) VIII No. 011.06/SK/RUT/2001 yang berjudul *Metode Transgenik dan Fusi Protoplas untuk Merakit Klon Kentang yang Tahan Terhadap Penyakit Layu Bakteri dan Busuk Lunak.* Penulis mengucapkan terimakasih pada Nia Dahniar, SP, Sarah, Iip dan Asep, teknisi di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Tanaman Pusat Penelitian Bioteknologi IPB dan Lab Bioteknologi Jurusan Budidaya Petanian IPB.

DAFTAR PUSTAKA

De Block, M. 1998. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens*. Theor. Appl. Genet. 76:767-774.

George, E.F., P.D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture: Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegenetic Lim, England. 709.

Menke, U., L. Schilde-Rentschler, B. Ruoss, C. Zank, V. Hemleben, H. Ninnemann. 1996. Somatic hybrids between the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. and 1 EBN wild species *Solanum pinnatisectum* Dun: morphological and molecular characterization. Theor. Appl. Genet. 92:617-626.

Millam, S., L.A. Payne, 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.

Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff. Netherlands. 334 pp.

Purwito, A. 1999. Fusi Protoplas intra dan interspecies pada tanaman kentang. Disertasi Program Pascasarjana IPB, Bogor. 223 hal.

Purwito, A., Asnawati, M. Machmud, A.A. Mattjik, G.A. Wattimena. 2002. Somatic hybridization between potato (*Solanum tuberosum*) and *S.phureja* to transfer bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) resistance traits. *In* : N.A. Ramos and J.M.B. Lapis (eds). Resource Management: Public-Private Partnership and Knowledge Sharing. SEAMEO SEARCA, Los Banos, Laguna, Phillipines.

Sihachakr, D., R. Haicour, I. Serraf, E. Barrientos, C. Herbreteau, G. Ducreux, L. Rossignol, and V. Souvannavong. 1988. Electrofusion for production of somatic hybrid plants of *Solanum melongena* L. and *Solanum khasianum* C.B. Clark. Plant Sci. 57:215-223.

Yadaf, N.R., M.B. Sticklen. 1995. Direct and efficient plant regeneration from leaf explant of *Solanum tuberosum* L. Cv. Bintje. Plant Cell. Rep. 14:645-647.