

## FUSI PROTOPLASMA DALAM RUMPUT LAUT

oleh

Nurul Dhewani Mirah Sjafrie <sup>1)</sup>

### ABSTRACT

PROTOPLAST FUSION IN SEAWEEDS. *Protoplast fusion techniques in various organism have been frequently used to search for new hybrids. The techniques require informations on the cell wall structure and knowledge in the type of enzymes in order to produce sufficient quantity of protoplasma. The widely used fusion techniques are the Polyethylene-glicol (PEG) and Electro fusion.*

### PENDAHULUAN

Selama beberapa tahun belakangan ini terlihat bahwa kemampuan para ahli dalam memanipulasi dan mempelajari kultur sel tumbuhan berkembang sangat pesat. Teknik kultur sel tumbuhan dapat diterapkan dalam berbagai bidang seperti : biokimia, genetika, fisiologi anatomi dan biologi sel (EVANS *et al.* 1983). Salah satu keuntungan dari kultur sel adalah dapat teratasinya penyediaan bibit secara berkesinambungan. Manfaat yang lebih jauh lagi dari kultur sel adalah dapat diciptakannya suatu varietas baru dengan jalan perkawinan silang organisme melalui teknik penggabungan protoplasma.

Teknik penggabungan protoplasma telah banyak dicoba oleh para ahli untuk mendapatkan suatu hibrid. Dalam bidang biologi laut khususnya di dalam mengembangkan budidaya rumput laut, beberapa ahli telah mencoba melakukan penggabungan protoplasma dari rumput laut yang sejenis maupun yang berlainan jenis. FUJITA & MIGITA (1987) telah melakukan pengga-

bungan protoplasma dari dua jenis rumput laut, yaitu *Porphyra yezoensis* yang berwarna merah keunguan dan *P. pseudolinearis* yang berwarna hijau. Dari hasil penelitian mereka diperoleh keturunan yang berwarna kehijauan. Penggabungan protoplasma dari 7 jenis rumput laut marga *Porphyra* di Jepang telah dilaporkan oleh FUJITA dan SAITO (1990). Selanjutnya REDDY *et al* (1989) telah melakukan penggabungan protoplasma dari 3 jenis alga hijau, yaitu *Ulva pertusa*, *U. conglobata* dan *U.fasciata*. B ALESTRI *et al.* (1989) mencoba mengisolasi dan menggabungkan protoplasma dari 2 jenis alga merah yaitu *Laurencia obtusa* dan *Plocamium cartilagenum*. Pada tulisan ini penulis akan mengemukakan secara umum tentang teknik penggabungan protoplasma pada rumput laut.

### FUSI PROTOPLASMA

Fusi protoplasma secara umum dapat diartikan sebagai penggabungan antara 2 atau lebih protoplasma dari suatu tanaman sejenis atau yang berlainan. Teknik fusi

---

1) Balai Penelitian dan Pengembangan Lingkungan Laut, Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi - LIPI, Jakarta.

protoplasma mulai dikembangkan para ahli sejak timbulnya anggapan bahwa hibridisasi antar 2 jenis tumbuhan dibatasi oleh seksual (EVANS 1983). Pada teknik ini beberapa pengetahuan dasar yang perlu diketahui antara lain adalah struktur dinding sel serta pengetahuan tentang enzim.

#### A. STRUKTUR DINDING SEL

Sebelum dijelaskan tentang struktur dinding sel, maka penulis akan menguraikan sekilas mengenai apa yang disebut protoplasma. Protoplasma adalah istilah yang diberikan kepada sel hewan atau tumbuhan tanpa adanya dinding sel, atau dapat diformulasikan sebagai:

Protoplasma = sel - dinding sel

Di dalam protoplasma sendiri terdapat komponen-komponen sel seperti ; mitokhondria, badan golgi, nukleus, retikulum endoplasma, vacuola dan sebagainya. Semua organ-organ tersebut merupakan komponen utama sel yang mencerminkan sifat-sifat genetik organisme yang bersangkutan. Oleh karena itu pada rekayasa genetika, protoplasma banyak dipergunakan orang sebagai material dasar.

Pengetahuan tentang struktur pembentuk dinding sel sangat diperlukan dalam menunjang keberhasilan kerja fusi protoplasma. Hal ini memegang peranan sangat penting pada saat penentuan jenis enzim yang akan digunakan untuk memecah dinding sel tanaman. Pada Tabel 1 diperlihatkan komponen utama dinding sel pada beberapa kelas rumput laut.

#### B. JENIS ENZIM

Pengetahuan tentang kerja enzim sama pentingnya dengan pengetahuan mengenai

struktur dinding sel. Keduanya akan merupakan pasangan harmonis yang dapat bekerja bersama-sama. Misalnya, apabila telah diketahui dinding sel dari suatu organisme, maka akan mudah untuk menentukan jenis enzim penghancur dinding sel tadi. Demikian pula sebaliknya.

Untuk memecah dinding sel rumput laut, umumnya para ahli menggunakan kombinasi dari beberapa jenis enzim, tergantung dari komposisi dinding sel rumput laut yang akan dipecah. Pada Tabel 2 diperlihatkan jenis enzim, yang digunakan untuk memecah dinding sel rumput laut serta jumlah protoplasma yang dihasilkan.

#### TAHAPAN KERJA

Metode penggabungan protoplasma terdiri dari beberapa tahapan, diawali dari persiapan sampel dan enzim, isolasi protoplasma, fusi protoplasma dan diakhiri dengan kultur.

##### 1. *Persiapan contoh*

Langkah awal adalah mencuci contoh rumput laut yang diambil dari alam dengan air laut yang telah difilter (FS) beberapa kali. Untuk memudahkan pekerjaan, dapat digunakan kuas atau sikat yang lembut. Selanjutnya sampel dicuci selama 5 menit dengan larutan deterjen 0,1% dan kemudian dibilas dengan air laut yang telah disterilisasi dengan autoclave (ASW). Untuk menghilangkan epifit seperti bakteri, hewan serta tumbuhan lain, larutan 11% XI. 112 dalam ASW dapat digunakan sebagai larutan pencuci. CHEN (1986) menggunakan 0,75 % Betadine sebagai larutan pencuci, sedangkan CHOU & LU (1989) menggunakan NaOC12 30 ppm sebagai larutan pencuci. Selanjutnya, larutan pencuci yang tersisa atau masih melekat pada sampel dimasukkan kedalam petridis

**Tabel 1. Komposisi utama dinding sel pada 3 kelas rumput laut (SOUTH & WHITTICK 1987)**

Kelas	xy	ma	pr	ce	gs	aa	fu	hs	gl
<b>Rhodophyta :</b>									
- Bangiophyceae	+	+	+						
- Floridophyceae				+	+				
<b>Phaeophyta</b>				+		+	+		
<b>Chlophyta</b>	+	+						+	+
<b>xy = xylan</b>				<b>Ce = celulosa</b>			<b>fu = fucoidin</b>		
<b>ma = mannan</b>				<b>gs = galaktan sulfat</b>			<b>hs = hemiselulosa</b>		
<b>pr = protein</b>				<b>aa = asam alginat</b>			<b>gl = glucan</b>		

yang berisi medium f/2 yang mengandung antibiotik. Menurut CHEN (1986) larutan antibiotik tersebut terdiri dari : 300 ug/ml Penicillin G; 100 ug/ml Streptomycin sulfat; 50 ug/ml Neomycin B; dan 200 ug/ml Kanamycin. Akhirnya sampel diinkubasikan selama 38-40 jam pada kondisi yang kurang cahaya (+ 1000 lux).

### 2. Persiapan Enzim

Pemilihan jenis enzim yang akan digunakan harus disesuaikan dengan sifat dinding sel tanaman yang akan dipecah, agar dapat diperoleh jumlah protoplasma seperti yang diharapkan. Jenis-jenis enzim yang digunakan umumnya adalah campuran antara enzim komersial (Drilase, cellulase R-10 atau RS, Maceroenzym R-10, Cellulase, Onozuka R-10 atau RS) dengan "crude enzym", "Crude enzym" diperoleh dari hasil ekstraksi kerang-kerangan, umumnya berasal dari jenis *Halotis* sp (CHOU & LU 1989), namun CHEN (1986) menggunakan *Littorina littoria* salah satu jenis Gastropoda,

sedangkan BALESTRI *et al.* (1989) menggunakan *Paracentrotus lividus* (sea urchin) sebagai "crude enzym".

### 3. Isolasi Protoplasma

Sampel yang telah diinkubasikan selama satu malam dicuci beberapa kali dengan ASW, selanjutnya thallus dipotong-potong 1 mm dan ditempatkan di dalam tabung reaksi. Di dalam tabung reaksi, potongan-potongan thallus dicuci dengan medium ESP (Enrich Seawater Provokali) 2-3 kali. Selanjutnya ke dalam tabung reaksi dimasukkan larutan enzim (5 % komersial enzym + 2 % crude enzym) yang telah dicampur dengan 0,6 M manitol dan 5 % Dextran sulfat. Fungsi larutan manitol adalah untuk menjaga tekanan osmotik protoplasma sedangkan dextran sulfat berfungsi untuk mencegah kerusakan ribonuclease dan lipase yang terdapat di dalam crude enzym. Akhirnya larutan enzim yang berisi thallus diletakkan dalam "mixer" dan diputar perlahan selama 1 jam dalam keadaan gelap.

**Tabel 2. Beberapa jenis enzim yang digunakan untuk memecah dinding sel rumput laut serta jumlah protoplasma yang dihasilkan (CHOU & LU 1989)**

Komposisi enzim	Jenis rumput laut	Protoplasma yang dihasilkan sel /ml
5% cellulase Onozuka R- 10: 1 M manitol	<i>Ulva lactuca</i>	> 10 <sup>5</sup>
	<i>Enteromorpha linza</i>	> 10 <sup>5</sup>
	<i>E. compressa</i>	> 10 <sup>4</sup>
5% cellulase Onozuka R - 10,67 ; abalone acekton powder : 1 M manitol	<i>Halemenia formosa</i>	< 10 <sup>3</sup>
0,5% pectolyse Y - 23: 6,67% abalone acetone powder ; 0,6 M manitol; 0,5 M CaCl <sub>2</sub>	<i>Porphyra agusta</i>	> 10 <sup>5</sup>
	<i>P. crispata</i>	> 10 <sup>4</sup>
3% cellulase Onozuka R - 10 : 3% macerozyme R-10: 0,5% pectolyase Y- 23:10% abalone acetone Powder : 1 M manitol	<i>Grateloupia ficilina</i>	> 10 <sup>3</sup>
	<i>Grateloupia sp</i>	> 10 <sup>3</sup>
3% cellulase Onozuka R- 10: 3% macerozyme R- 10: 0,5% pectolyase Y- 23: 10% abalone acetone Powder : 0,8 M manitol 5 M CaCl <sub>2</sub>	<i>Grateloupia tenuispitata</i>	
	Var. <i>liui</i>	> 10 <sup>5</sup>
	<i>G. chorda</i>	> 10 <sup>4</sup>
	<i>G. salicornia</i>	> 10 <sup>3</sup>
	<i>G. gigas</i>	0

#### 4. Pemurnian Protoplasma

Pada tahap pemurnian, pertama-tama larutan dipindahkan dalam tabung centrifuge dan diputar dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Kepada endapan yang terbentuk ditambahkan 0,6 M manitol. Hal yang sama diulangi beberapa kali.

#### 5. Fusi Protoplasma

Sampai saat ini cara menggabungkan dua atau lebih protoplasma pada rumput laut yang berhasil dilakukan hanya dua cara, yaitu metode PEG dan Elektrofusi.

#### a. Metode PEG (*Polyethylene Glikol*)

Teknik fusi protoplasma dengan metode Polythilene Glikol pertama kali dilakukan oleh KAO & MICHAYLUK untuk menggabungkan protoplasma pada tanaman tinggi (dalam EVANS & BRAVO 1983). Selanjutnya teknik ini dicoba para ahli untuk menggabungkan protoplasma rumput laut. Walaupun teknik PEG banyak diikuti, namun tingkat keberhasilan metode ini sangat kecil. Hasil fusi yang diperoleh umumnya lebih kecil dari 1 % (CHOU & LU 1989), atau berkisar antara 8 % - 10 % (FUJITA & SAITO 1990).

Tahapan kerja fusi protoplasma dengan metode PEG adalah sebagai berikut : Sebanyak 100 ul protoplasma yang telah dimurnikan di tuangkan ke dalam "cover slip" (24 x 24 mm) yang ditempatkan di dalam petridis berukuran (9 x 2 cm) dan dibiarkan selama 10 menit. Setelah itu ke dalam petridis ditambahkan 30 — 40 mg Polyethilene glikol (PEG) 4000 powder atau 100 ul - 200 ul PEG 4000 larutan, selanjutnya di biarkan selama 15—20 menit. Akhirnya protoplasma dicuci dengan larutan PEG pencuci dan siap dikultur di dalam medium f/2. Komposisi dari medium f/2 disajikan dalam Tabel 3.

#### b. Metode *Electrofusion*

Beberapa tahun belakangan ini terbukti bahwa fusi protoplasma dapat juga dilakukan dengan bantuan energi listrik. Cara ini disebut metode Elektrofusi, dan alatnya dikenal dengan "Somatic Hybridizer". Tingkat keberhasilan fusi protoplasma dengan teknik elektrofusi lebih tinggi jika dibandingkan dengan teknik PEG. Hal ini dibuktikan antaranya oleh hasil penelitian FUJITA dan SAITO (1990) yang memperlihatkan bahwa tingkat keberhasilan fusi proto-

plasma pada 7 jenis *Porphyra* adalah 20 %. Keadaan inilah yang menjadi salah satu sebab mengapa teknik PEG mulai ditinggalkan.

Tahapan kerja dengan menggunakan "Somatic Hybridizer" adalah sebagai berikut: protoplasma yang telah dimurnikan di cuci beberapa kali dengan larutan elektrofusi (cara kerjanya sama dengan pemurnian protoplasma). Kemudian 200 ul larutan ini (protoplasma dalam larutan elektrofusi) diletakkan di antara 2 elektroda di dalam ruang fusi, dibiarkan selama 5 menit agar mengendap pada dasar ruang fusi, setelah itu diberi aliran listrik untuk mendapatkan ikatan 2 atau 3 rantai protoplasma. Keterpaduan warna protoplasma dari 2 sel yang berbeda akan terlihat jelas pada hasil fusi. Namun untuk mengetahui perbedaan warna tidaklah mudah terutama bagi mereka yang baru memulai bekerja di bidang tersebut.

Tingkat keberhasilan metode elektrofusi ini sangat tergantung pada kondisi optimum dari "Somatic Hybridizer" pada saat pengoperasiannya. Berdasarkan hasil percobaan yang telah dilakukan oleh FUJITA dan SAITO (1990), kondisi optimum untuk memperoleh hasil fusi yang baik disajikan dalam Tabel 4.

#### 6. Kultur protoplasma

Hasil fusi pada tahapan 5 segera dipindahkan ke dalam petridis yang berisi medium f/2 (FUJITA & SAITO 1990) atau dapat juga digunakan medium ESP (Provasoli's Enrich Sewater yang ditambah anti biotik dan tanpa penambahan Vitamin) (REDDY *et al* 1989). Beberapa publikasi menyebutkan bahwa untuk menekan pertumbuhan bakteri sebaiknya dipergunakan medium yang mempunyai nilai osmotik

**Tabel 3. Komposisi medium f/2 (FUJITA & SAITO 1990)**

NAH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	36 um
NaNO <sub>3</sub>	882 um
sequestren 138 Fe	5 mg
Tris (Hydroximethyl) Aminomithine	5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	5 mM
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,04 um
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,077 um
CoCL <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,042 um
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,91 um
NaMO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,026 um
Biotin	05 ug
Cyanocobalmin	0,05 ug
Thiamine, H <sub>2</sub> O	0,1 mg

**Tabel 4. Kondisi optimum untuk memperoleh hasil fusi pada jenis Porphyra (FUJITA dan SAITO 1990)**

Parameter elektrik	Nilai antara	Nilai optimum
Frekwensi	1 MHz	1 MHz
Voltase AC	10 - 40 V	10 V
Waktu	10 - 25 detik	20 detik
Voltase DC	150 - 350 V	250 V
Kekuatan elektrik	1,5 - 3,5 Kv cm <sup>-1</sup>	2.5 Kv cm <sup>-1</sup>
Lebar pulsa	10 - 70 us	40 us

tinggi. Selang 4 hari berikutnya, protoplasma akan menempel pada dasar petridis dan pada saat ini dapat dilakukan penggantian medium. Untuk jenis Porphyra biasanya protoplasma tidak mau menempel di dasar petridis, oleh sebab itu penggantian medium harus di bawah mikroskop secara hati-hati.

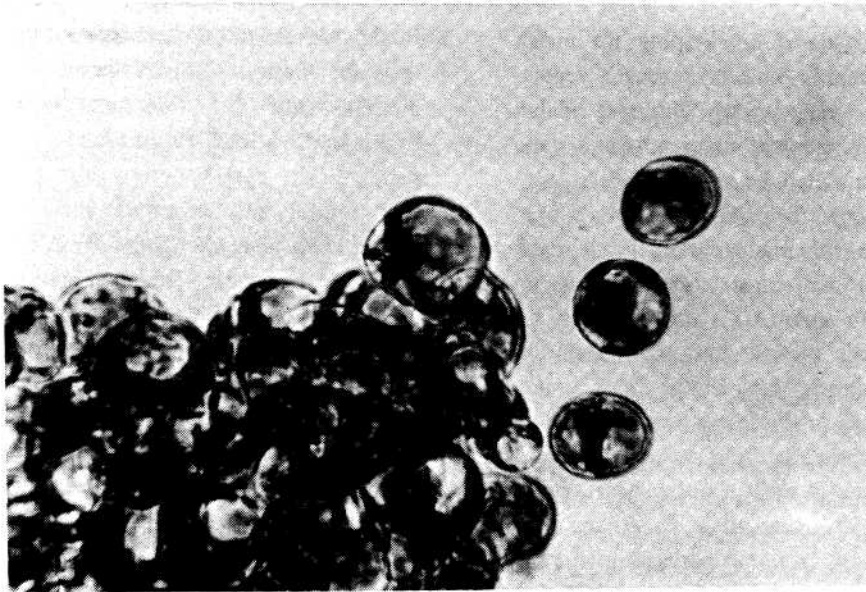
#### PROSPEK PENGEMBANGAN

Dalam kaitannya dengan kondisi budidaya rumput laut di Indonesia, tampaknya teknik fusi protoplasma akan memberikan suatu alternatif baru. Sudah menjadi rahasia umum bahwa budidaya rumput laut kita masih sangat tergantung dari bibit yang di-

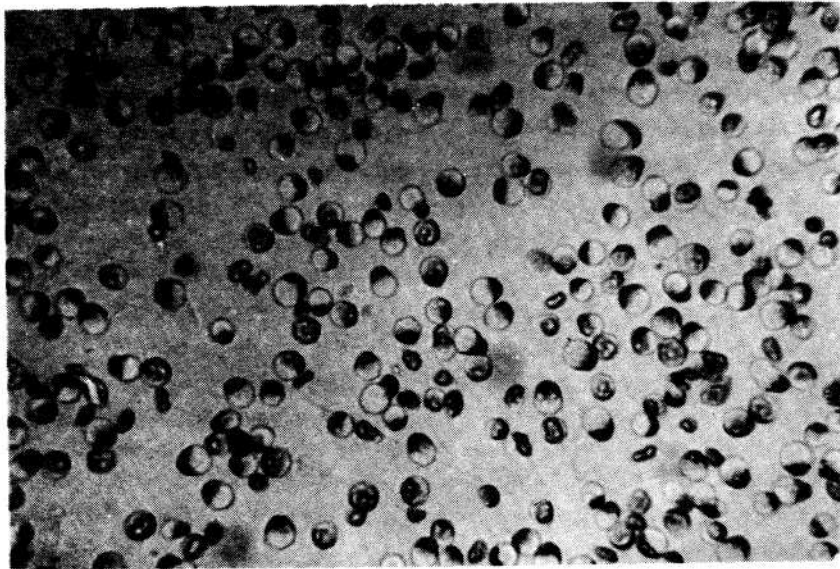
peroleh dari alam, di samping itu masih digunakan teknik budidaya secara vegetatif. Kendala yang sering dijumpai adalah kualitas hasil, pertumbuhan tanaman yang lambat, daya tahan tanaman terhadap kondisi lingkungan perairan dan sebagainya. Sedangkan untuk mendapatkan hasil panen yang berkesinambungan dengan disertai kualitas serta kuantitas yang optimum diperlukan jenis rumput laut yang memiliki sifat-sifat unggul. Maka bukan tidak mungkin teknik fusi protoplasma dapat digunakan untuk mendapatkan bibit unggul. Oleh karena itu penulis menyarankan agar teknik ini dapat dikembangkan di Puslitbang Ose-anologi - LDPI. Adapun perlengkapan yang dibutuhkan pada kerja fusi protoplasma antara lain :

1. Ruang kultur yang dirancang sedemikian rupa sehingga suhu cahaya dapat diatur.
2. Ruang untuk melakukan fusi yang dilengkapi dengan lemari asam (clean bench); satu set "Simadzu somatic hybridizer" SSH-2 (Shimadzu Co., Japan), terdiri dari beberapa alat penunjang teknik fusi termasuk mikroskop.
3. Ruang kerja yang dilengkapi dengan auto clave; refrigerator; freezer; centrifuge besar dan kecil; shaker; mikroskop; timbangan analitik serta peralatan gelas.
4. Selain itu diperlukan juga bahan-bahan kimia untuk membuat medium serta enzim.

Sebagai tenaga di laboratorium fusi protoplasma, dibutuhkan sekurang-kurangnya 2 orang tenaga yang terdiri dari seorang staf dan seorang teknisi. Mereka haruslah memiliki ketelitian, kesabaran, dedikasi dan tanggung jawab yang tinggi.

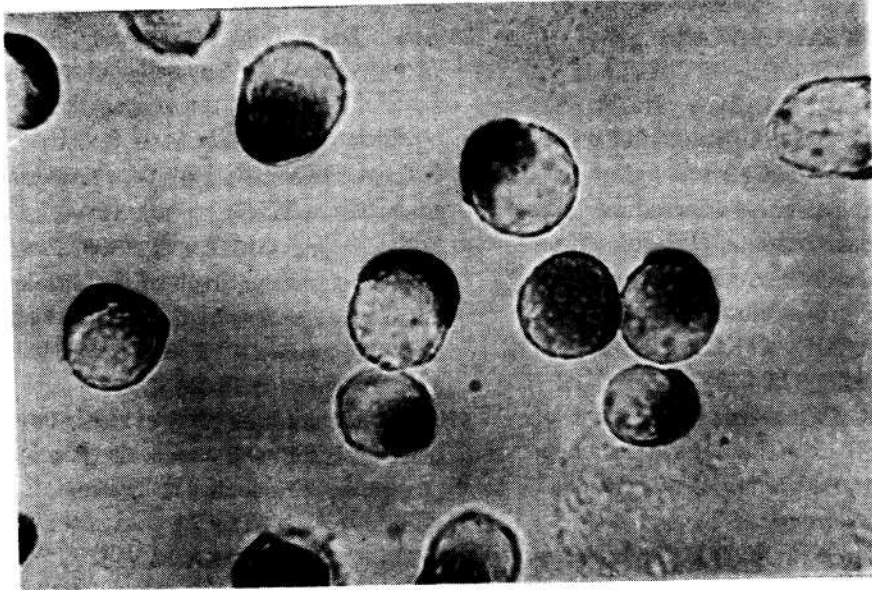


Gambar 1. Proses terlepasnya protoplast dari thallus rumput laut  
(pembesaran 40x, sumber : penulis)

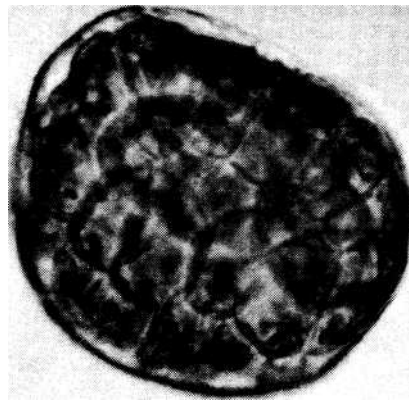


Gambar 2. Protoplast segar *Ulva* sp. (pembesaran 10x, sumber : penulis)





**Gambar 3. Protoplast segar *Ulva* sp. (pembesaran 40x, sumber: penulis)**



**Gambar 4. Kultur protoplast *Ulva* sp. yang berumur 1 minggu (pembesaran 40x, sumber : penulis)**

### DAFTAR PUSTAKA

- BALESTRI, E; F. DELLA PIETA and F. CINELLI, 1989. Production of protoplasts from two red marine algae : *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux and *Plocamium cartilagenum* (L.) Dixon from Mediterranean Sea. *In*: Proc. 1st. Intl. Marine Biotechnology Conference (S. MIYACHI; I. KURABE & Y. ISHIDA eds.): 375 - 378
- CHEN, LJM.C. 1986. Cell development of *Porphyra miniata* (Rhodophyceae) under axenic culture. *Botanica Marina* 29 : 435 - 439.
- CHOU, H.N and H. K. LU. 1989. Protoplast from seaweeds : isolation, culture and fusion. *In* : Proc. 1st. Intl. Marine Biotechnology Conference (S. MIYAKI; I. KURABE and Y. ISHIDA eds.): 227 - 230.
- EVANS, D.A. and J.E. BRAVO. 1983. Protoplast isolation and culture. *In* : Handbook of Plant cell culture Volume I; Techniques for propagation and breeding (EVANS, D.A; W.R. SHARP; P.V. AMMIRATO and Y. YAMADA eds.): 124-178.
- EVANS, DA. 1983. Protoplast Fusion. *In* : Handbook of Plant cell culture Volume I : Technique for propagation and breeding (EVANS, DA; W.R. SHARP; P.V. AMMIRATO and Y. YAMADA eds.): 291 - 321.
- FUJITA, Y. and MIGITA, S. 1987. Fusion of protoplast from thalli of two different color types in *Porphyra yezoensis* Ueda. and development of fusion products. *Jap. J. Phycol.* 35 : 201 - 208.
- FUJITA, Y. and SAITO, M. 1990. Protoplast isolation and fusion in *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 161-166.
- REDDY, C.R.K; S. MIGITA and Y. FUJITA. 1989. Protoplast isolation and regeneration of three species of *Ulva* in axenic culture. *Botanica Marina* 32 : 483-490.
- SOUTH, R.G. and A. WHITTICK. 1987. *Introduction to Phycology*. Blackwell Scientific Publications, London : 341 pp.