

ISOLASI DAN KULTUR PROTOPLAS RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* DI LABORATORIUM

Emma Suryati^{*)}, Andi Tenriulo^{*)}, dan Sri Rejeki Hesti Mulyaningrum^{*)}

ABSTRAK

Isolasi protoplas rumput laut *K. alvarezii*, telah dilakukan dalam rangka penyiapan protoplas untuk penyilangan melalui fusi protoplas. Metode yang digunakan antara lain melalui cara kimia dengan melisis tallus rumput laut dengan campuran enzim komersial, kemudian enzim yang berasal dari viscera keong mas baik yang segar maupun yang beku, dengan media kultur yang digunakan pada pemeliharaan makro algae antara lain Conwy, PES, dan air laut steril. Tallus rumput laut yang digunakan berasal dari bagian pangkal, tengah dan ujung. Protoplas yang hidup diuji menggunakan evans blue 0,1%, hormon perangsang tumbuh yang digunakan pada media pertumbuhan antara lain auxin, IAA, dan Kinetin. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah protoplas hidup, pertumbuhan, dan sintasan. Hasil percobaan memperlihatkan bahwa enzim yang paling baik digunakan adalah campuran enzim komersial dengan media kultur Conwy dengan jumlah protoplas mencapai $19,8 \times 10^6$ sel/mL, bagian tallus yang paling baik adalah bagian pangkal berkisar antara $8,1 \times 10^6$ hingga $18,8 \times 10^6$ sel/mL. Perangsang tumbuh yang paling baik adalah auxin. Filamen terbentuk setelah 5 hari dengan fotoperiod L:D=12:12.

ABSTRACT: *Isolation and protoplast culture of seaweed Kappaphycus alvarezii in laboratory. By: Emma Suryati, Andi Tenriulo, and Sri Redjeki Hesti Mulyaningrum*

Isolation of seaweed's protoplast Kappaphycus alvarezii had been done to provide protoplast for crossbreeding purpose by protoplast fusion. The method was chemically done by lyses of tallus used commercial enzyme mixture, enzyme from viscera of snail both fresh and frozen, culture media were Conwy (CW), PES, and sterile sea water (SSW) which were used to maintain the macro algae. Part of used tallus were upper, middle and tip of tallus. The viable protoplast was examined by using 0.1% evans blue and the growth-stimulating hormone were auxin, IAA, and Kinetin. Observation was concerned to the amount of viable protoplast, the growth, and the long live. Result showed that the best enzyme was commercial enzyme mixture with Conwy as the best culture media, provided protoplast until 19.8×10^6 cell/mL. The greatest protoplast content was in upper part of tallus, it could provide protoplast about 8.1×10^6 cell/mL until 18.8×10^6 cell/mL, and the best growth-stimulating hormone was auxin. Filament was formed after 5 days with photoperiod L: D=12:12.

KEYWORDS: *isolation, culture, protoplast, Kappaphycus alvarezii*

PENDAHULUAN

Budi daya rumput laut (*Kappaphycus alvarezii*) khususnya di Sulawesi Selatan telah menjadi pusat perhatian dalam dekade terakhir ini. Permintaan bahan baku karaginan semakin tinggi dan juga didukung oleh ketersediaan

pabrik pengolahan rumput laut yang memadai. Dengan melihat potensi budi daya rumput laut yang tinggi tersebut, Sulawesi Selatan ditetapkan sebagai sentra produksi rumput laut di Indonesia. Penyediaan benih rumput laut dapat berasal dari alam, budi daya, dan perbenihan baik secara vegetatif maupun

^{*)} Peneliti pada Balai Riset Perikanan Budidaya Air Payau, Maros

generatif (Parenrengi *et al.*, 2007). Namun kendala yang dihadapi antara lain merosotnya mutu benih pada budi daya. Hal ini antara lain disebabkan penggunaan benih dari alam secara berulang dapat mengakibatkan penurunan baik kualitas maupun kuantitasnya serta sangat rentan terhadap penyakit.

Teknik kultur jaringan menjanjikan perbanyak benih secara berkesinambungan dan berkualitas tinggi, namun untuk mendapatkan galur yang baik perlu ada persilangan antar spesies. Hal ini dapat dilakukan melalui kultur protoplas yang nantinya dapat disilangkan melalui fusi protoplas berdasarkan variasi genetik yang telah diketahui sebelumnya. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan beberapa tahun terakhir yaitu kultur jaringan rumput laut dan analisis genetik rumput laut, diperoleh beberapa informasi mengenai media yang baik pada perbanyakan secara *in vitro* (Amini *et al.*, 1995; Suryati *et al.*, 2002) serta karakter genetik dari beberapa varietas rumput laut (*K. alvarizii*) yang ada di Indonesia pada umumnya (Parenrengi *et al.*, 2006). Dalam rangka perbaikan mutu genetik dari *K. alvarezii*, tidak hanya dilakukan dengan kultur jaringan dari tallus saja, tetapi perlu adanya penyilangan antar spesies agar diperoleh bibit dengan mutu yang lebih tinggi baik rendemen karaginan maupun pertumbuhan dan ketahanannya terhadap penyakit. Penyilangan melalui fusi protoplas spora dari *Gracillaria* sp. telah dilakukan oleh Cheney (1999) dilanjutkan oleh Salvador & Serrano (2005), yang telah berhasil mengisolasi protoplas menggunakan enzim dari ekstrak enzim abalon segar dengan kepadatan berkisar antara $2,8 \times 10^3$ sampai $8,2 \times 10^3$.

Berdasarkan keberhasilan para ahli yang terdahulu, maka isolasi protoplas *K. alvarezii* dilakukan untuk persiapan kultur dan fusi protoplas menggunakan beberapa macam enzim, media kultur dan hormon perangsang tumbuh yang berbeda. Dari penelitian tersebut diharapkan dapat memperoleh bibit rumput laut (*K. alvarezii*) yang memiliki sifat genetik yang unggul, kandungan karaginan tinggi, tahan terhadap penyakit serta dapat diaplikasikan oleh masyarakat luas.

BAHAN DAN METODE

Rumput laut yang diisolasi protoplasnya dipilih berdasarkan keunggulan-keunggulan karakteristik genetik yang diperoleh

sebelumnya, serta menggunakan eksplan hasil kultur jaringan dengan pertumbuhan yang maksimal. Penelitian yang dilakukan terutama diarahkan untuk mendapatkan protoplas rumput laut *K. alvarezii* yang siap untuk silangkan melalui fusi protoplas, pada tahap awal adalah memilih enzim yang paling baik untuk melisis sel rumput laut, serta media kultur yang tepat pada isolasi dan kultur protoplas rumput laut (*K. alvarizii*) di laboratorium.

Persiapan Induk dan Tallus Rumput Laut

Rumput laut *K. alvarezii* diperoleh dari beberapa daerah di Sulawesi Selatan antara lain dari Kab. Takalar dan Jeneponto. Rumput laut dipilih yang segar dan bersih dari kotoran yang melekat pada saat panen, diangkut dengan stereofom ditambah dengan sargassum hidup, dicuci dengan air laut steril, disikat dengan sikat lembut untuk menghilangkan parasit yang menempel pada tallus, kemudian disterilkan menggunakan desinfektan dan campuran antibiotik. Aklimatisasi dilakukan pada tangki yang berisi air laut steril dan diaerasi.

Tallus rumput laut yang telah diaklimatisasi, dibersihkan, dan dilap menggunakan tissue, kemudian dipotong kurang lebih 2—5 cm, dimasukkan kedalam botol kultur yang berisi 75 mL air laut steril dan 25 mL campuran antibiotik (OTC, vancomycin, dan nalidixic acid dalam air laut masing-masing 10 mg/L), selama 30 menit sampai 1 jam, timbang dengan hati-hati 0,1 g bobot segar dari tallus tersebut. Masing-masing tallus diriris dengan ketebalan 1 mm menggunakan scalpel steril dimasukkan kedalam botol vial.

Penyediaan Enzim Komersial dan Enzim Segar dari Keong Mas

Larutan enzim dibuat dengan kondisi temperatur rendah (0°C — 4°C), dilarutkan secara terpisah menggunakan pelarut campuran dari: 40% media kultur PES (Uchida *et al.*, 1991), Conwy (Liao *et al.*, 1983), dan SSW dan 60% *buffer* fosfat 0,1 M. Dari larutan tadi dibuat kombinasi enzim dan ditambahkan larutan mannitol (1,0 M) dan CaCl_2 (5 mM) di atur pada pH= 6,0—6,1 disaring menggunakan milipore 0,2 μm (cellulose nitrat).

Keong mas (*Pila polita*) diambil bagian visceranya, disimpan pada suhu 4°C . Kurang lebih 40—50 g viscera keong mas, ditambah *buffer* fosfat 50 mM, dengan perbandingan 1g

viscera di dalam 20 mL *buffer*, dihomogenkan menggunakan *tissue homogenizer*, disaring dengan kertas saring 2 μm . Mannitol (0,6 M) dan CaCl_2 (5 mM) ditambahkan dengan volume yang sama. pH larutan diatur pada 6,1. Larutan enzim yang dihasilkan disaring dengan kertas saring Whatman 42, selanjutnya sterilisasi dingin melalui penyaringan menggunakan membran filter dengan porositas 0,2 μm (sellulase nitrat).

Isolasi Protoplas

Tallus rumput laut yang telah ditimbang kurang lebih 0,1 g diiris kurang lebih 1 mm dimasukkan kedalam vial (10 mL), tambahkan larutan enzim yang telah disiapkan dengan beberapa variasi baik enzim komersial maupun enzim segar yang berasal dari keong mas. Tempatkan pada *shaker* dengan kondisi gelap diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Setelah diinkubasi kemudian di saring menggunakan filter "mary cloth" dengan porositas 100 mikron, dan ditampung pada tabung *centrifuge*. Kemudian disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 100 rpm/menit untuk memisahkan cairan pada protoplas tersebut. Setengah dari larutan tersebut dipisahkan menggunakan mikro pipet, kemudian ulangi dan terakhir tambahkan 2 mL *washing medium* kedalam protoplas tersebut.

Uji Viabilitas dan Pertumbuhan Protoplas

Untuk mengetahui protoplas yang hidup dan yang mati, dilakukan tes dengan penambahan zat warna antara lain *evan blue* atau *methylen blue* dengan konsentrasi 0,05% yang dilarutkan di dalam air laut steril. Protoplas hidup dan mati dapat dibedakan dengan warna di mana protoplas hidup dapat menyerap warna dan mengapung, sedangkan yang mati tidak dapat menyerap warna, protoplas yang hidup dapat dihitung menggunakan SRC.

Untuk mengetahui pertumbuhan protoplas pada media tumbuh dilakukan dengan meletakkan 0,5 mL protoplas hidup yang telah diisolasi kedalam tabung kultur yang telah berisi media kultur yang diperkaya dengan pupuk Conwy, PES, dan air laut steril masing-masing sebanyak 10 mL dengan penambahan zat perangsang tumbuh antara lain IAA, kine-tin, dan auxin dengan konsentrasi masing-masing 4 mg/L, perbandingan LD=12:12, pertumbuhan dari protoplas diamati dengan interval waktu 24 jam di bawah mikroskop.

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi dan Kultur Protoplas di Laboratorium

Hasil isolasi protoplas menggunakan enzim komersial (*macerozym* dan enzim *sellulase*) dan ekstrak viscera keong mas memperlihatkan perbedaan pada jumlah protoplas viable yang terisolasi dengan media kultur yang digunakan. Jumlah protoplas yang paling tinggi diperoleh dari enzim komersial mencapai $19,8 \times 10^6$ sel/mL, kemudian ekstrak viscera keong mas beku dan segar masing-masing pada media kultur yang diperkaya dengan pupuk Conwy. Sedangkan yang paling rendah adalah dari viscera keong mas beku pada media kultur SSW dengan jumlah protoplas $3,7 \times 10^6$ sel/mL (Gambar 1). Jumlah protoplas ini lebih tinggi dari perolehan yang dikerjakan oleh Salvador & Serrano (2005) yang memperoleh protoplas hidup berkisar antara $2,8 \times 10^3$ sampai $8,2 \times 10^3$ menggunakan enzim yang berasal dari ekstrak enzim abalon segar.

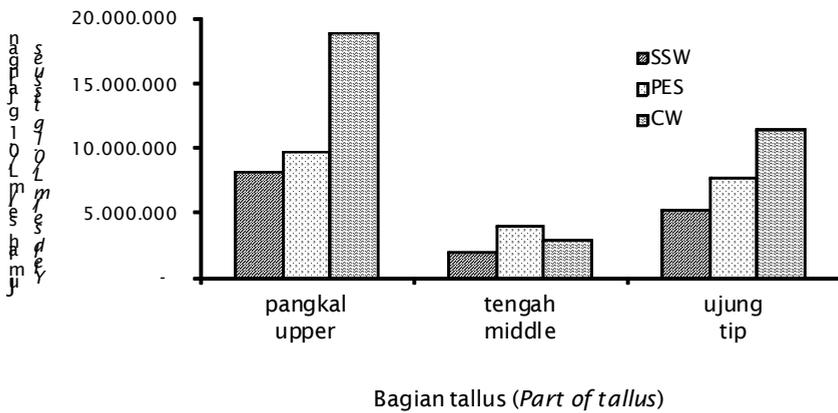
Media kultur yang paling baik digunakan adalah media kultur yang diperkaya dengan pupuk Conwy dengan enzim komersial memperlihatkan perolehan protoplas yang paling tinggi hal ini sangat erat hubungannya dengan aktivitas enzim serta kondisi lingkungan pada saat melisis. Aktivitas enzim dari viscera keong mas lebih rendah bila dibandingkan dengan enzim komersial, selain itu enzim dari viscera keong mas sangat rentan dan mudah terkontaminasi sehingga perlu perlakuan yang sangat hati-hati, namun lebih ekonomis apabila dibandingkan dengan enzim komersial, sehingga dapat direkomendasi untuk penggunaan selanjutnya.

Penggunaan bagian tallus pada rumput laut (pangkal, tengah, dan ujung) memberikan hasil protoplas yang berbeda, dan sangat tergantung dari rumput laut yang diisolasi. Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa jumlah protoplas yang paling tinggi pada bagian pangkal berkisar antara $8,1 \times 10^6$ hingga $18,8 \times 10^6$ sel/mL, kemudian pada bagian tengah berkisar antara $1,9$ — $3,9 \times 10^6$ sel/mL, dan terakhir adalah pada bagian ujung berkisar pada $5,2$ — $11,3 \times 10^6$ sel/mL (Gambar 2). Hal ini antara lain disebabkan karena protoplas diperoleh melalui interaksi enzim dengan sel rumput laut. Untuk memudahkan interaksi, maka sebelum penambahan enzim, tallus rumput laut diiris melintang untuk



Gambar 1. Jumlah protoplas hidup dari jaringan (*K. alvarezii*) yang diberi perlakuan enzim komersial, viscera keong mas (*P. polita*) beku dan segar

Figure 1. Yield of viable protoplast from tissues *K. alvarezii* treated with commercial enzymes, freeze and fresh *P. polita*



Gambar 2. Jumlah protoplas rumput laut (*K. alvarezii*) hidup dari bagian jaringan yang berbeda menggunakan enzim komersial

Figure 2. Yield of viable protoplast from tissues obtained from different tallus segment treated with commercial enzymes

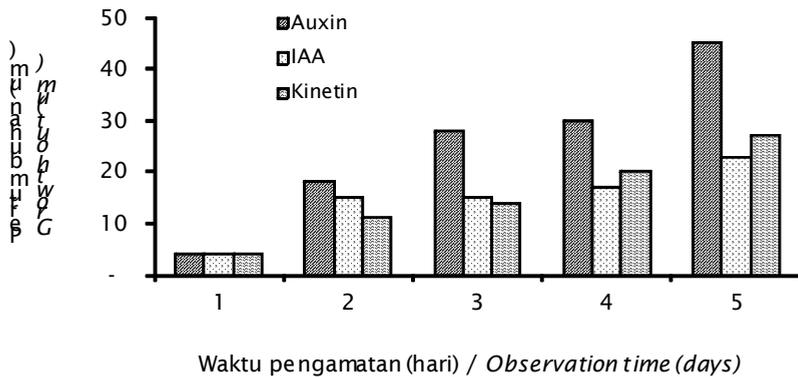
memudahkan enzim kontak dengan dinding sel sehingga dengan sendirinya protoplas keluar dari dalam sel. Permukaan irisan rumput laut pada bagian pangkal lebih luas dibandingkan dengan bagian tengah maupun ujung, sehingga protoplas yang diperoleh lebih banyak dibandingkan bagian lainnya. Sedangkan pada bagian tengah walaupun luas permukaannya agak lebih luas dibandingkan dengan ujung, namun sel dan protoplas pada

bagian ini masih dalam taraf pembelahan dan perbanyakkan sel sehingga pada saat dilisis protoplas hidup yang terisolasi banyak yang rusak. Demikian juga pada bagian ujung permukaannya agak kecil namun sel dan protoplasnya lebih lengkap dibandingkan dengan tallus bagian tengah sehingga protoplas yang diperoleh memperlihatkan jumlah yang lebih banyak dibandingkan pada tallus bagian tengah.

Hasil uji viabilitas dari protoplas yang terisolasi memperlihatkan penyerapan warna dari protoplas yang hidup dengan zat pewarna metylen blue, menyebar dan mengapung pada larutan media sedangkan protoplas yang mati tidak dapat menyerap warna dan mengendap pada dasar tabung demikian juga protoplas yang tidak sempurna. Protoplas yang hidup dapat dipisahkan dengan mikro pipet secara hati-hati dipindahkan kedalam wadah dan media kultur yang baru kemudian diamati dan dihitung jumlahnya dengan haemocytometer menggunakan mikroskop.

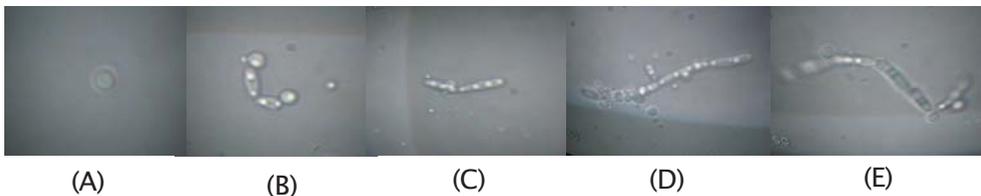
Hasil percobaan penggunaan hormon perangsang tumbuh pada media kultur yang diperkaya dengan pupuk Conwy memperlihatkan zat perangsang tumbuh yang paling baik adalah auxin (Gambar 3). Auxin dengan konsentrasi 4 mg/L memperlihatkan pertumbuhan hingga 40 um, sedangkan untuk

IAA dan kinetin hanya mencapai 23 um dan 27 um pada hari ke delapan (Gambar 4). Zat pengatur tumbuh pada tanaman umumnya diperlukan sebagai komponen medium dan pertumbuhan diferensiasi kalus. Tanpa penambahan zat pengatur tumbuh dalam medium pertumbuhan akan terhambat bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali, pengaruh rangsangan auxin terhadap pertumbuhan protoplas menunjukkan adanya indikasi adanya tekanan osmotik, meningkatkan sintesa protein, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, dan melunakkan dinding sel yang diikuti dengan menurunnya tekanan pada dinding sehingga air dapat masuk kedalam sel dan meningkatkan volume sel, maka dengan demikian dapat digunakan sebagai sumber tenaga dalam pertumbuhan (Hendaryono & Wijayani, 1994).



Gambar 3. Pertumbuhan protoplas rumput laut (*K. alvarezii*) yang diberi perlakuan zaat perangsang tumbuh pada media kultur

Figure 3. *Protoplast growth out treated with growth regulator hormone in culture medium*



Gambar 4. Pertumbuhan protoplas rumput laut (*K. Alvarezii*) hari 1 sampai hari ke-8. (A) hari ke 1, (B) hari ke-2, (C) hari ke-4, (D) hari ke-6, (E) hari ke-8

Figure 4. *K. alvarezii* protoplast growth out, 1 day until 8 day (A) 1 day, (B) 2 days, (C) 4 days, (E) 8 days

Budi daya protoplas rumput laut *K. alvarezii* dilakukan dengan media kultur yang diperkaya dengan pupuk Conwy pada suhu 25°C dengan fotoperiod terang: gelap 12:12. Pertumbuhan protoplas rumput laut (*K. alvarezii*) pada hari 1 hingga hari ke-8 dapat dilihat pada Gambar 4.

Pembelahan sel dari protoplas memperlihatkan pembelahan yang simetris, sel membelah pada 24 jam pertama dilanjutkan hingga 48 jam, kemudian memanjang membentuk sel yang panjang dan pembelahan dilanjutkan terus menerus membentuk serabut pembentukan jaringan akan dilakukan secara diferensial dengan pembelahan sel secara terus-menerus.

Protoplas adalah sel hidup yang telah dihilangkan dinding selnya sehingga sering disebut dengan sel telanjang. Dinding sel merupakan bagian sel mati yang berfungsi melindungi seluruh bagian sel yang berada di dalamnya terhadap faktor-faktor luar baik fisik maupun kimiawi yang berpengaruh terhadap sintasan dari sel tersebut, selain itu juga berfungsi untuk mengatur transportasi nutrisi yang dibutuhkan oleh sel baik yang masuk maupun yang keluar melalui dinding sel (Cheney, 1999).

Protoplas terdiri atas sitoplasma dan vacuola, plasma dasar, organela, dan sistem membran terdapat pada sitoplasma yang mempunyai substansi dasar terdiri atas protein, lemak, asam nukleat, dan senyawa-senyawa yang larut dalam air, sedangkan pada organela terdapat nukleus, plastida antara lain kloroplas, kromoplas dan leukoplas, mitokondria dan organela lainnya yang sangat penting dalam pertumbuhan protoplas maupun sel individu yang telah dewasa (Zablackis et al., 1993).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada isolasi protoplas rumput laut (*K. alvarezii*) antara lain dapat disimpulkan bahwa:

1. Enzim yang paling baik digunakan untuk melisis sel *K. alvarezii* adalah enzim komersial.
2. Media kultur yang paling baik untuk budi daya protoplas rumput laut adalah media Conwy.
3. Bagian tallus rumput laut yang menghasilkan protoplas paling banyak adalah pada bagian pangkal.
4. Zat perangsang tumbuh yang sesuai adalah

auxin dengan konsentrasi 4 mg/L.

5. Fusi protoplas dapat dilakukan dengan kondisi tersebut di atas.

DAFTAR PUSTAKA

- Amini, S., M. Amin, dan A. Parenrengi. 1995. Penelitian kultur jaringan rumput laut, *Eucheuma* sp. secara vegetatif. *Laporan hasil penelitian ARMP Balitkandita*, Maros. 16 pp.
- Cheney, D.P. 1999. Strain improvement of seaweeds through genetic manipulation: current status. *World Aquaculture*. 30: 55—56, dan 65.
- Hendaryono, D.P.S dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan Pengenalan dan Petunjuk Perbanyak Tanaman secara Vegetatif-Modern*. Kanisius. 138 pp.
- Liao, I.C., H.M. Su, and J.H. Lin. 1983. Larval foods for penaeid prawns. In Mc Vey, J.P. and J.R. Moore (Eds.). *CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture* volume I, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. p. 43—69.
- Parenrengi, A., Sulaeman, E. Suryati, dan A. Tenriulo. 2006. Karakterisasi genetik rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang dibudidayakan di Sulawesi Selatan. *Jurnal Riset Akuakultur*. 1(1): 1—11.
- Parenrengi, A., E. Suryati, dan Rachmansyah. 2007. Penyediaan benih dalam menunjang kebun bibit dan budidaya rumput laut, *Kappaphycus alvarezii*. *Makalah disampaikan pada Simposium Nasional Riset Kelautan dan Perikanan*, 7 Agustus 2007 di Jakarta. 12 pp.
- Salvador, R.C. and A.E. Serrano. 2005. Isolation of Protoplast from Tissue Fragments of Philippine cultivars of *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta). *J. of Applied Phycology*. 17: 15—22.
- Suryati, Sulaeman, A. Dalfiah, dan R. Pasande. 2002. Teknik Kultur Jaringan Rumput Laut *Eucheuma* sp. dalam Rangka Penyediaan Benih pada Budidaya. *Seminar Nasional Rumput Laut dan Mini Simposium Mikroalgae dan Kongres Ikatan Fikologi Indonesia*. 8 pp.
- Uchida, T., K. Yoshikawa, A. Aray, and S. Aray. 1991. Life cycle and its control of *Sargassum muticum* (Phaeoophyta) in bath culture. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 57(12): 2,249—2,255.
- Uyenco, F.R., L.S. Saniel, and G.S. Jacinto. 1981. The "Ice-ice" Problem in Seaweed Farm-

ing. *10th International Seaweed Symposium*. Walter de Gruyter, New York. p. 625—630.

Zablackis, E. Vreeland V., and B. Kloareg. 1993. Isolation of protoplast from *Kappaphycus alvarezii* var Tambalang (Rhodophyta) and secretion of iota -carrageenan fragment by cultured cell. *J. Exp. Bot.* 44(266): 1,515—1,522.