

Kryopreservasi Sebagai Upaya Konservasi Plasma Nutfah Jangka Panjang Secara *in Vitro* Beberapa Genotipe Pisang (*Musa Spp L.*)

(As A Conservation Efforts Kryopreservasi Plasma Nutfah Long-Term In Vitro In Some Banana Genotypes (*Musa spp L.*))

oleh:

Wiwik Hardaningsih¹⁾, Muzakkir²⁾, Irfan Suliansyah³⁾

1) Staf Pengajar Jur. Budidaya Tanaman Pangan Politeknik Pertanian Unand

2) Staf Pengajar Jur. Budidaya Tanaman Perkebunan Politeknik Pertanian Unand

3) Staf Pengajar dan Guru Besar Prodi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Unand

ABSTRACT

Research on long-term conservation of germplasm various banana genotypes (*Musa spp L.*) with kryopreservasi in liquid nitrogen (-196°C temperature) has been conducted at the Laboratory of Tissue Culture and Germplasm Conservation ITFRI Solok. This study aims to: know the method of conservation of banana germplasm with long-term conservation kryopreservasi suitable for a variety of banana genotypes. The results showed that: kryopreservasi method that can used for long term storage is a method of slow freezing (slow cooling cryopreservation) by using the vitrification method given the addition of PVS2 cryoprotectant atthawing temperatures 40°C.

Key words: Conservation, germplasm, Musa spp, kryopreservasi

PENDAHULUAN

Plasma nutfah tumbuhan berfungsi dan berperan penting bagi kehidupan manusia di bumi karena dari plasma nutfah inilah dapat dirakit bibit unggul. Terdapat banyak tumbuhan yang dipandang tidak berguna dinataranya jenis pisang liar mungkin memiliki sifat khusus dan sangat berharga dalam perakitan varietas unggul. Sifat khusus ini sering baru diketahui dan diperlukan setelah timbul keadaan darurat.

Erosi plasma nutfah telah berlangsung sangat cepat sehingga banyak jenis tumbuhan asli sulit dijumpai bahkan punah jika dicari di habitat aslinya. Pisang merupakan kelompok tumbuhan yang erosinya tergolong pesat, sedangkan manfaat pisang sangat besar bagi kebutuhan manusia maka seharusnya dilakukan usaha untuk melestarikannya.

Pelestarian berbagai sumber genetika tumbuhan tersebut telah dilakukan di kebun koleksi, kebun botani, cagar alam dan kebun percobaan (Mariska *et al.*, 1993).

Tujuan utama konservasi *in vitro* adalah mereduksi laju pertumbuhan yang dilakukan dengan manipulasi. Metode yang dikembangkan untuk tujuan ini adalah penyimpanan pada suhu rendah dan dengan pengurangan pencahayaan. Metode ini sangat praktis berbagai tanaman. Untuk meningkatkan interval waktu subkultur, perlakuan pada suhu rendah sering dikombinasikan dengan minyak mineral, menambah bahan osmotika, menurunkan tekanan atmosfer, dan zat penghambat tumbuh, seperti asam absisik

Metode lain seperti penggunaan dehidrasi jaringan partial juga telah dikembangkan (Abdullah, 1991; Bajaj; 1986; Kartha, 1981; Mariska *et al.*, 1996; Taylor, Paul, dan Dukie, 1993), tetapi, metode ini atas tidak dapat dilakukan untuk konservasi jangka panjang. Untuk memenuhi maksud ini maka digunakan metode kriopreservasi (Wattimena, 1991).

Keadaan lingkungan fisik tempat penyimpanan plasma nutfah secara *in vitro* akan mempengaruhi keberhasilan konservasi *in vitro*, terutama pengaturan suhu baik untuk penyimpanan jangka pendek maupun jangka panjang. Imelda dan Soetisno (1992) menyatakan bahwa untuk penyimpanan jangka pendek tanaman tropik menghendaki suhu 15°–20°C, sedangkan untuk tanaman subtropik menghendaki suhu 0° – 6°C. Penyimpanan jangka panjang dikenal kriopreservasi yang mencerminkan suhu sangat rendah yaitu -196°C pada nitrogen cair.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui metode konservasi plasma nutfah pisang jangka panjang dengan kryopreservasi yang sesuai untuk konservasi berbagai genotipe pisang.

METODE PENELITIAN

Percobaan telah dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Laboratorium Biologi Molekuler Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Solok, Sumatera Barat dari Januari - September 2007.

Metode kriopreservasi yang dicobakan terdiri atas 2 macam metode yakni 1) Pembekuan Lambat (*slow cooling cryopreservation*) menggunakan metode vitrifikasi dengan krioprotektan larutan PVS2 pada tahap prakultur, dan

2) Pembekuan Langsung (*simple freezing cryopreservation*) tidak menggunakan krioprotektan.

Pada tiap metode kriopreservasi dilakukan penyimpanan dalam nitrogen cair selama 24 jam. Perlakuan Thawing (pelelehan) tiap metode kriopreservasi dilakukan pada 2 jenis suhu thawing 35°C (B1) dan 40°C (B2).

Percobaan ini dilakukan dengan Rancangan Acak lengkap (RAL) berfaktor. Satuan percobaannya adalah eksplan dalam botol kultur dengan tiap satuan percobaan diulang tiga kali.

Bahan tanam yang digunakan adalah planlet beberapa genotipe pisang yang diperoleh dari Balitbu Solok terdiri atas Pisang: Batu, Buai, Tembaga Merah, Baman, Lidi, dan Jari Buaya.

Tahapan percobaan dilaksanakan dengan 1) sterilisasi alat, 2) persiapan dan pembuatan larutan L1 dan PVS2, medium P5, medium regenerasi P6, 3) penyediaan eksplan, 4) Metode kriopreservasi I yang meliputi; persiapan eksplan, dehidrasi dan pembekuan cepat setelah prakultur, penyimpanan eksplan, thawing (pelelehan pada suhu 35°C dan 40°C), unloading untuk pratumbuh, Regenerasi, dan 5) pelaksanaan metode kriopreservasi II yakni Pembekuan Langsung.

Pengamatan dilakukan terhadap variabel respon : 1) persentase eksplan yang hidup (%) dan 2) persentase eksplan bertunas (%). Pengamatan dilakukan pada akhir percobaan, dinyatakan sebagai eksplan membentuk kalus termasuk eksplan yang hidup. Pengamatan persen eksplan bertunas dilakukan sejak minggu ke 2 kultur sampai mulai terbentuk tunas pertama. Data yang diperoleh dari variabel respons untuk inisiasi dianalisis ragam univariat dan dilanjutkan dengan BNT taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase eksplan yang hidup dan eksplan bertunas setelah perlakuan *Slow Cooling Cryopreservation* dengan krioprotektan PVS2

Hasil pengamatan terhadap persentase eksplan hidup dan persentase eksplan bertunas akibat *Slow Cooling Cryopreservation* dengan Krioprotektan PVS2 memperlihatkan pengaruh nyata. Persentase eksplan yang hidup dan persentase eksplan bertunas setelah *Slow Cooling Cryopreservation* disajikan pada Tabel 1 dan 2.

Persentase Eksplan yang Hidup dan eksplan bertunas setelah Perlakuan *Fast Freezing Cryopreservation*

Hasil pengamatan Persentase Eksplan hidup dan eksplan bertunas setelah Perlakuan *Fast Freezing Cryopreservation* tidak nyata. Persentase eksplan hidup dan bertunas setelah *Fast Freezing Cryopreservation* disajikan pada Tabel 3 dan 4.

Pada Tabel 1 persentase eksplan yang hidup pada perlakuan *Slow Cooling Cryopreservation* dengan Krioprotektan PVS2 umur 6 minggu setelah kriopreservasi menunjukkan perbedaan yang nyata antara suhu thawing (pelelehan) 35 ° C dengan 40° C dengan persentase hidup hampir 100 % pada suhu 40° C, sedangkan untuk persentase eksplan

bertunas disajikan pada Tabel 2 juga memperlihatkan pada suhu 40 °C respon berbeda nyata dengan persentase 66.3 % pada pisang Batu. Secara umum untuk tiap genotipe pisang menunjukkan respon yang tidak nyata.

Persentase eksplan yang hidup pada perlakuan *fast freezing Cryopreservation* tanpa Krioprotektan (Tabel 3) umur 6 minggu setelah kriopreservasi untuk suhu thawing (pelelehan) 30°C tidak ada yang berhasil hidup, sedangkan pada suhu thawing (pelelehan) 40°C dengan persentase hidup hanya mencapai 14 %. Variabel persentase eksplan bertunas (Tabel 4).

Pada suhu thawing 35 °C dan 40 °C memperlihatkan respon tidak hidup sama sekali. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena jarring meristem pisang masih sangat muda, tanpa krioprotektan sebagai perlindungan sel langsung terkena frost suhu rendah yakni 96 °C mengakibatkan kerusakan jaringan dan sel tanaman. Jika pembekuan terlalu cepat maka sel kurang mengalami dehidrasi sehingga terjadi formasi es intraseluler yang bersifat letal elektrolit dalam sel menjadi tinggi. Penambahan krioprotektan dapat memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi. Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan jangka panjang. Dalam hal ini, bahan tanaman disimpan di dalam nitrogen cair bersuhu -196 °C.

Tabel 1. Persentase eksplan hidup 6 minggu setelah slow cooling cryopreservati

Suhu Thawing (°C)	Eksplan Pisang Hidup (%)					
	Bamban	Buai	J. Buaya	Lidi	Batu	T. Merah
30	81 b	76 b	71 b	61 c	66 b	71 b
40	100 a	95a b	90 a	81 ab	95 a	95 a

Angka pada lajur diikuti huruf kecil sama berbeda nyata menurut BNT 5%.

Tabel 2. Persentase eksplan bertunas setelah perlakuan *slow cooling cryopreservation*

Suhu Thawing (°C)	Eksplan Pisang bertunas (%)					
	Bamban	Buai	J. Buaya	Lidi	Batu	T. Merah
35	18.7 b	9.3 b	18.7 b	4.7 b	23.3 b	18 b
40	52.3 ab	47.7 a	47.7 a	38 a	66.3 a	61 a

Angka pada lajur diikuti huruf kecil sama berbeda nyata menurut BNT 5%.

Tabel 3. Persentase eksplan hidup 6 minggu setelah *fast freezing cryopreservation*

Suhu Thawing (°C)	Eksplan Pisang Hidup (%)					
	Bamban	Buai	J. Buaya	Lidi	Batu	T. Merah
35	0	0	0	0	0	0
40	14	0	14	0	14	0

Angka pada lajur berbeda tidak nyata setelah diuji BNT taraf nyata 5%

Tabel 4. Persentase eksplan bertunas setelah *fast freezing cryopreservation*

Suhu Thawing (°C)	Eksplan Pisang Hidup (%)					
	Bamban	Buai	J. Buaya	Lidi	Batu	T. Merah
35	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0

Angka pada lajur berbeda tidak nyata setelah diuji BNT taraf nyata 5%

Pada suhu tersebut, bahan tanaman hampir sama sekali tidak mengalami proses metabolisme sehingga masa penyimpanan menjadi tidak terbatas dapat mencapai 20 tahun. Penyimpanan dengan cara tersebut tidak memerlukan tindakan subkultur yang berulang sehingga lebih efisien dari segi biaya, waktu, ruang penyimpanan, dan tenaga. Jika pembekuan terlalu lambat maka sel terlalu terdehidrasi sehingga konsentrasi zat.

Pemberian krioprotektan PVS2 pada *slow cooling cryopreservation* diduga merupakan pelindung bagi jaringan meristem atau pucuk planlet pisang yang masih sangat muda, sehingga terjadi adaptasi secara perlahan-lahan krioprotektan masuk ke dalam jaringan atau sel, baru kemudian terjadi penurunan suhu sedikit demi-sedikit.

Menurut Kartha (1985), senyawa dalam krioprotektan dapat dipisah menjadi dua, yaitu senyawa yang dapat

masuk ke sel (*permeating agent*) seperti DMSO, gliserol (pada suhu tertentu) dan yang tidak dapat masuk ke dalam sel (*non permeating agent*) seperti sukrosa dan gula alkohol (manitol, sorbitol). Pada teknik pembekuan cepat, faktor yang menentukan keberhasilan kriopreservasi bergantung pada teknik yang diterapkan. Untuk teknik pratumbuh, keberhasilan ditentukan oleh jenis dan komposisi krioprotektan dalam media tumbuh. Untuk teknik vitrifikasi, enkapsulasi vitirifikasi, dan *droplet freezing*, keberhasilan ditentukan oleh jenis, konsentrasi, dan lama perendaman dalam krioprotektan.

Secara umum, tipe dan keadaan fisiologis bahan juga menentukan keberhasilan kriopreservasi. Selama pembekuan dan pelelehan, sel tanaman dapat mengalami kerusakan sebagai akibat dari (1) eksposur bahan tanaman pada suhu rendah, (2) formasi kristal es, (3) sel terdehidrasi, dan (4) formasi radikal

bebas (Reinoud *et al.*, 2000). Eksposur pada suhu rendah dapat menyebabkan inaktivasi protein yang sensitif terhadap suhu dingin (Usami *et al.*, 1995 dalam Reinoud *et al.*, 2000). Sebagian besar formasi es intraseluler bersifat letal dan pada dasarnya sel dapat mentolelir formasi es ekstraseluler. Namun, formasi es ekstraseluler juga dapat merusak sel karena daya mekanis dari kristal es yang tumbuh, gaya adesi kristal es terhadap membran, interaksi elektris yang disebabkan oleh perbedaan solubilitas ion pada fase es dan cair, formasi gelembung udara intraseluler, luka Themis yang berhubungan dengan peroksidase lipid dan perubahan pH pada lokasi tertentu (Grout, 1995).

Sel yang terdehidrasi terlalu kuat dapat mengalami plasmolisis yang kuat sehingga berakibat terhadap perubahan pH, interaksi mikromolekuler, dan peningkatan konsentrasi zat elektrolit (Towill 1991 dalam Reinoud *et al.*, 2000). Pada saat pelelehan, kontraksi osmotik dapat menyebabkan endositotik vesikulasi irreversibel yang mengakibatkan sel lisis karena bahan membran yang baru tidak mampu memfasilitasi deplasmolisis (Steponkus 1984 dalam Reinoud *et al.*, 2000). Formasi radikal bebas juga dapat menyebabkan kerusakan sel. Radikal bebas yang dapat terbentuk misalnya radikal hidroksil (OH), superoksida (O₂), dan hidrogen peroksida (H₂O₂). Radikal bebas dapat merusak fraksi lipid pada membran dan menghasilkan lipid peroksida dan selanjutnya terurai menjadi senyawa produk oksidasi sekunder yang toksik.

Penggunaan bahan tanaman yang masih muda lebih baik dari pada bahan yang sudah tua. Sel tanaman yang tumbuh secara eksponensial lebih toleran terhadap pembekuan daripada sel pada pembekuan dari pada sel pada fase log atau stasioner. Sel dengan volume

terkecil yang memiliki vakuola berukuran kecil dengan kandungan air yang relatif sedikit juga menentukan keberhasilan kriopreservasi. Prakultur sel pada manitol atau sorbitol yang menyebabkan penurunan volume vakuola dengan cara redistribuís vakuola sentral yang besar menjadi sejumlah vesikel yang lebih kecil. Tindakan praperlakuan dimaksudkan untuk meningkatkan toleransi bahan tanaman terhadap dehidrasi. Beberapa tanaman hanya menghendaki perlakuan prakultur, namun terdapat tanaman yang memerlukan perlakuan pratumbuh. Menurut Grout (1995) bahwa pengaruh perlakuan pratumbuh adalah akumulasi zat terlarut, reduksi isotonik air, perubahan struktural seperti reduksi volume vakuola, dan perubahan struktur membran dasar.

Pada praperlakuan, bahan tanaman diperlakukan dengan senyawa osmoprotektan yang dapat meningkatkan fleksibilitas membran sel. Senyawa yang dapat digunakan pada praperlakuan adalah gula (sukrosa, malibiosa, trehalosa), gula alkohol manitol dan sorbitol), asam amino (asparagin, alanin, prolin) (Goldner *et al.*, 1991). Senyawa lain yang dapat digunakan pada praperlakuan adalah hormon (ABA) dan antioksidan. ABA merupakan hormon tanaman yang terlibat dalam respon terhadap stres lingkungan dan aplikasi senyawa vitamin C sebagai antioksidan dapat menurunkan lipid peroksidase.

Untuk melindungi jaringan tanaman dari pengaruh negatif pada saat pembekuan diperlukan kondisi sel yang mengalami dehidrasi. Kondisi dehidrasi yang optimal dapat dicapai dengan menggunakan larutan krioprotektan pada jenis, konsentrasi, dan lama perendaman yang sesuai. Krioprotektan yang baik digunakan untuk melindungi jaringan selama pembekuan.

Sakai (1993) menyatakan bahwa krioprotektan yang dapat digunakan untuk kriopreservasi adalah (1) PVS1 (gliserol 22% + propilen glikol 13% + etilen glikol 13% + DMSO 6% dalam media dasar dengan sukrosa 3%), (2) PVS2 (gliserol 30% + etilen glikol 15% + DMSO 15% dalam media dasar dengan sukrosa 0,4 M), (3) PVS3 (gliserol 50% dalam media dasar dengan sukrosa 50%), dan (4) PVS4 (gliserol 35% + etilen glikol 20% dalam media dasar dengan sukrosa 0,6 M).

Tahap yang juga menentukan keberhasilan kriopreservasi adalah perlakuan pelelehan dan pasca pelelehan. Pada saat pelelehan diupayakan jaringan tidak mengalami rekristalisasi es karena kondisi yang kurang optimal. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pelelehan cepat lebih baik dari pada pelelehan lambat karena kenaikan suhu yang cepat tidak memberi kesempatan bagi cairan sel membeku kembali. Dalam hal ini, suhu yang diterapkan harus tidak menyimpang dari kondisi fisiologis jaringan. Selain itu, media pemulih yang digunakan harus mampu mempertahankan daya hidup kultur. Media pemulih yang optimal selain mempertahankan daya hidup juga dapat meregenerasikan kultur tanpa pembentukan formasi kalus intermedier. Formasi kalus intermedier tidak diharapkan karena dapat menimbulkan keragaman somaklonal.

KESIMPULAN

Metode kryopreservasi yang dapat digunakan untuk penyimpanan jangka panjang adalah metode pembekuan lambat dan menggunakan metode vitrifikasi dengan penambahan krioprotektan PVS2 dan suhu pelelehan 40 °C.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A. 1991. Kegunaan kultur jaringan dalam pelestarian plasma nutfah. Buletin Penelitian Tanaman Industri 2: 35 – 49.
- Bajaj, Y.P.S. 1986. In vitro preservation of genetic resources. Tehniques and Problems, p.43 – 57. In Proceedings of an International Symposium on Nuclear Techniques and In vitro Culture for Plant Improvement International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Grout, B.W.W. 1995. Introduction to the *in vitro* preservation of plant cells, tissues and organs. In Grout, B. (Ed.). Genetic Preservation of Plant Cells *In Vitro*. Springer Lab Manual. Berlin-Heidelberg. p. 1-17.
- Imelda, M. dan Soetisno. 1992. Aplikasi Bioteknologi dalam konservasi Plasma Nutfah Tanaman Industri. Prosiding Forum Komunikasi Ilmiah Penelitian Aplikasi Bioteknologi Kultur Jaringan Industri. 18;41-50
- Kartha, K.K. 1981. Meristem Culture and Cryopreservation Methode and Application. In Thorpe (Ed). Plant Tissue Culture Methode and Application Agriculture. Academic Press. New York
- Katuuk, J.R.P. 1989. Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropropagasi Tanaman Institut Keguruan dan Ilmu Pendidikan Manado. Proyek pengembangan Pendidikan tenaga Kependidikan. Jakarta. 188 hal.
- Mariska, I. dan D. Seswita, 1993. Pengaruh lamanya penyimpanan dan zat penghambat terhadap regenerasi biakan pule pandak. Prosiding Seminar Hasil

- Penelitian Bioteknologi.
Puslitbang Bioteknologi LIPI.
Bogor 6-7 September.
- Reinhou, P.J., F.V. Iren, and J.W. Kijne. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. *In* Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application. IPGRI.Rome-Italy. p. 91-102.
- Mariska, I. dan D. Seswita, 1993. Pengaruh lamanya penyimpanan dan zat penghambat terhadap regenerasi biakan pule pandak. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bioteknologi. Puslitbang Bioteknologi LIPI. Bogor 6-7 September.
- Reinhou, P.J., F.V. Iren, and J.W. Kijne. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. *In* Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application. IPGRI.Rome-Italy. p. 91-102.
- Sakai, A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plant cultured cells and meristem colled to -196°C. In Sakai, A. (Ed.). Cryopreservation of Plant Genetic Resources. JICA. Japan. p. 1-25.
- Taylor, Paul W. J dan Dukie, 1993. Development of an in vitro culture technique for conservation of *Saccharum spp.* hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 34 :217-222
- Wattimena, G.A. 1991. Bioteknologi Tanaman. PAU Bioteknologi IPB. Bogor. 507 hal.