

PENELITIAN TEKNOLOGI KONSERVASI PLASMA NUTFAH (TU 01.02)

PRESERVASI TANAMAN KEHUTANAN SECARA IN VITRO

E. Sudarmonowati

D. Priadi

H. Karsono

PROYEK PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOTEKNOLOGI

PUSLITBANG BIOTEKNOLOGI-LIPI

CIBINONG

1995

PENDAHULUAN

Hutan Indonesia kaya akan bermacam-macam jenis kayu tropik. Untuk melindungi plasma nutfah hutan dari erosi oleh hama dan penyakit, bencana alam atau masalah yang menyangkut sistem reproduksi seperti tidak dimungkinkannya penyimpanan dengan biji untuk biji yang rekalsitran diperlukan konservasi. Salah satu upaya konservasi adalah konservasi secara *in vitro*.

Teknik konservasi *in vitro* dapat digolongkan menjadi dua bagian, yaitu dengan cara menghambat pertumbuhan dan menghentikan pertumbuhan serta metabolisme. Penghambatan pertumbuhan dapat dilakukan dengan cara mengubah kondisi tumbuh atau memodifikasi media, sedangkan menghentikan pertumbuhan dilakukan dengan teknik kriopreservasi yaitu preservasi pada suhu ultra rendah (-196°C) yakni suhu nitrogen cair. Penyimpanan di dalam nitrogen cair perlu dikembangkan karena ekonomis dan memerlukan sedikit tenaga kerja. Preservasi tunas pucuk dengan teknik kriopreservasi telah berhasil pada beberapa jenis tanaman seperti kacang tanah (Bajaj, 1976), stroberi (Karthi et al., 1980), ketela pohon (Sudarmonowati et al. 1992).

Penelitian ini bertujuan untuk mencari metode preservasi *in vitro* yang cocok untuk tanaman kehutanan seperti *A. mangium* dan *P. falcataria* yang merupakan model untuk penelitian preservasi tanaman kayu lainnya terutama yang berbiji rekalsitran.

BAHAN DAN CARA

A. Penghambatan pertumbuhan

Tunas pucuk *A. mangium* dan *P. falcataria* panjang 1,5 mm dikultur pada media MS yang mengandung sukrosa atau sorbitol dalam berbagai konsentrasi (2, 4, dan 6 %) dibandingkan

dengan 2% sukrosa sebagai kontrol.

B. Kriopreservasi

Tunas pucuk panjang 1,5 mm diinkubasi pada media MS yang mengandung sumber karbohidrat konsentrasi tinggi selama beberapa hari. Sebelum dibekukan secara bertahap sampai suhu terminal tertentu, tunas pucuk direndam dalam larutan krioprotektan DMSO selama beberapa jam. Tunas pucuk yang telah dibekukan dicairkan kembali (thawing) pada media cair yang komposisinya sama dengan media inkubasi selama 30 menit. Setelah dikeringkan pada kertas tisu steril, tunas pucuk dikultur pada media regenerasi yang komposisinya sama dengan media inkubasi. Konsentrasi karbohidrat pada media regenerasi diturunkan 2% setiap interval 3 hari.

Untuk meningkatkan daya hidup telah dilakukan enkapsulasi tunas pucuk dalam 2% Na-alginat sebelum diinkubasi atau sebelum direndam dengan larutan krioprotektan.

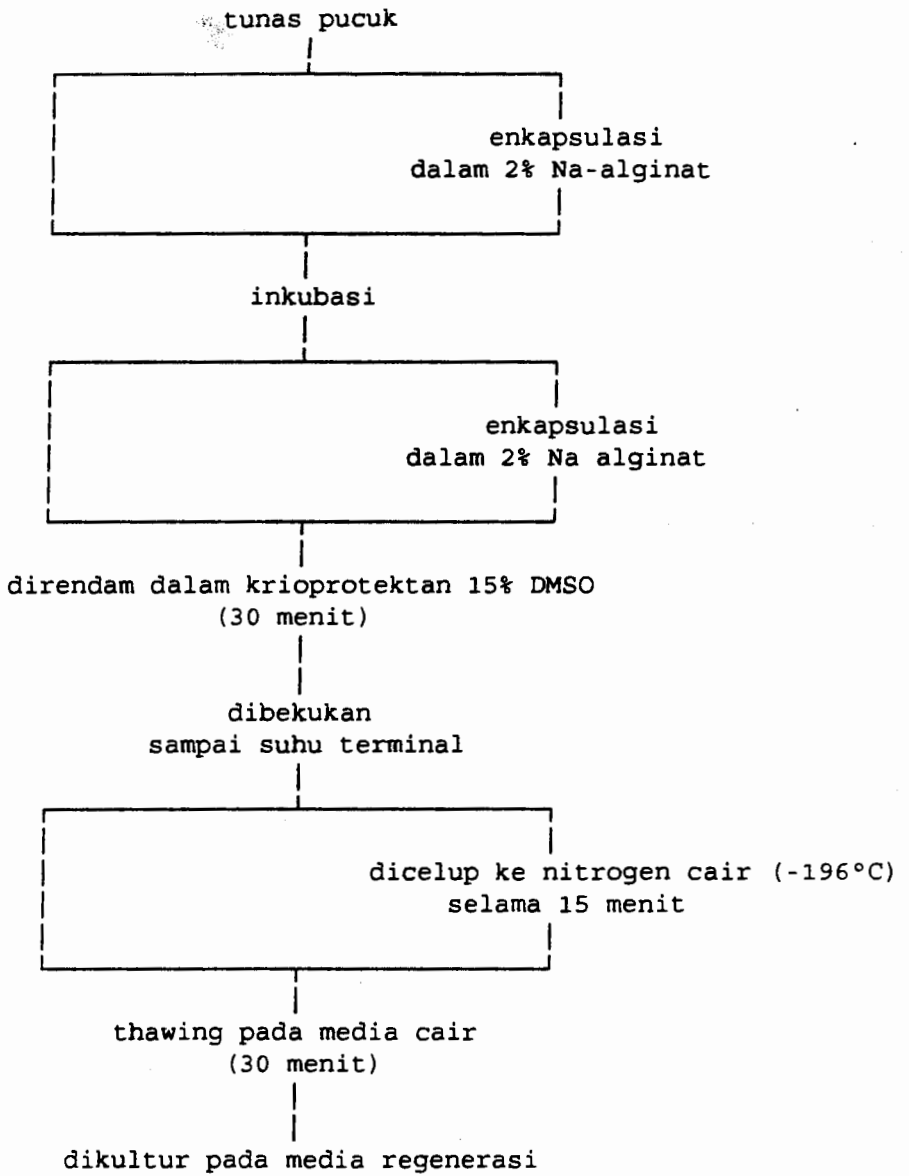
C. Vitrifikasi

Tunas pucuk *A. mangium* dan *P. falcataria* panjang 1,5 mm diinkubasi pada media yang mengandung 9% sorbitol dengan atau tanpa 0,5 mg/l NAA selama beberapa hari. Sebelum dice-lup ke dalam nitrogen cair selama 15 menit, tunas pucuk direndam dalam larutan vitrifikasi selama beberapa menit. Telah dicoba berbagai komposisi dan konsentrasi larutan vitrifikasi. Tunas pucuk yang telah dice-lup ke dalam nitrogen cair dithawing pada media cair yang komposisinya sama dengan media inkubasi selama 25 menit. Kemudian tunas pucuk dikeringkan pada kertas tisu steril dan dikultur pada media regenerasi yang komposisinya sama dengan media inkubasi.

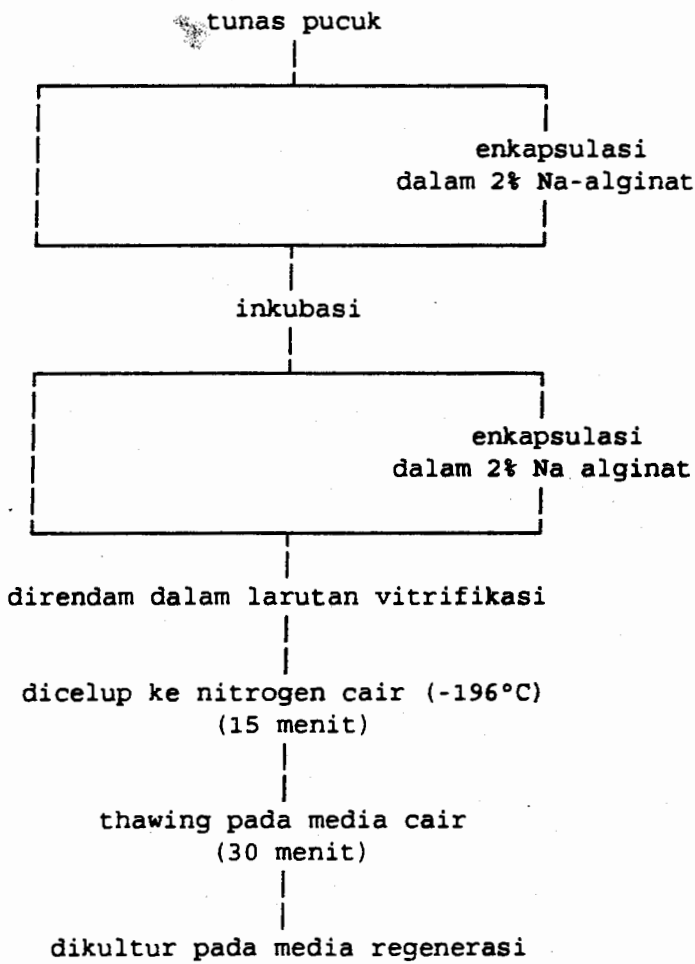
Dilakukan pula enkapsulasi tunas pucuk dalam 2% Na-alginat seperti pada kriopreservasi.

Ringkasan penelitian kriopreservasi dan vitrifikasi dapat dilihat pada diagram di bawah ini.

A. Kriopreservasi



B. Vitrifikasi



Kultur hasil preservasi disimpan pada ruangan yang bersuhu $25 \pm 1^\circ\text{C}$ dengan fotoperiode 16 jam.

Pengamatan pertumbuhan/daya hidup tunas pucuk menggunakan mikroskop OLYMPUS tipe SZ-PT (Jepang).

Ringkasan penelitian preservasi *in vitro* yang telah dilaksanakan pada tahun 1994/1995 dapat dilihat pada tabel 1 di bawah ini.

**TABEL 1. RINGKASAN PENELITIAN PRESERVASI TANAMAN KEHUTANAN
SECARA IN VITRO**

Jenis	Teknik	Media	Lama ink. prafreez. (hari)	Larutan krioprotektan/ vitrifikasi(%)	Laju pendinginan (°C/menit)	Suhu terminal (°C)
P. falcataria	- slow growth	- sukrosa : 2,4,6% - sorbitol : 2,4,6%				
	- kriopreservasi	-glukosa (8%)+ 2 mg/l BAP	3	DMSO (15) + glukosa (8)	0,5	-10, -20
		-glukosa (6%)+ 2 mg/l BAP	3	DMSO (15) + glukosa (6)	1(24°C-->-5°C -->0,3°C	-30
	- kriopreservasi + pengeringan	-sukrosa (6%) 2 mg/l BAP	3	DMSO (15) + sukrosa (6)	1(24°C-->-5°C -->0,3°C	-30
	- kriopreservasi + enkapsulasi a.	-sukrosa (8%) 2 mg/l BAP	6	DMSO (15) + sukrosa (8)	1(24°C-->-5°C -->0,3°C	-30
		sukrosa (8%) 2 mg/l BAP	6	DMSO (15) + sukrosa (8)	0,3(24°C->-5°C -->0,3°C	-30
	- kriopreservasi + enkapsulasi b.	-sukrosa (8%) 2 mg/l BAP	6	DMSO (15) + sukrosa (8)	1(24°C-->-5°C -->0,3°C	-30
	- vitrifikasi	-sorbitol(9%) + 2mg/l BAP tanpa atau + 0,5 mg/l NAA	2,4,6,8, 14	22 glycerol + +17/20 ethyl- ene glycol + 17/20 propyl- ene glycol + 7/15 DMSO		

Jenis	Teknik	Media	Lama ink. prafreez. (hari)	Larutan krioprotektan/vitrifikasi(%)	Laju pendinginan (°C/menit)	Suhu terminal (°C)
	- vitrifikasi	-sukrosa(2%)	3	30 sorbitol + 24 ethylene glycol + 4/6 Bovine Serum Albumin		
	- vitrifikasi + enkapsulasi a. dan b.	-sorbitol(9%) + 2mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA	6	22 glycerol + 17 ethylene glycol + 17 propylene glycol + 7 DMSO		
	- vitrifikasi + enkapsulasi a. dan b.	-sorbitol(9%) + 2mg/l BAP + 0,5 mg/l NAA	6	22 glycerol + 15 ethylene glycol + 15 propylene glycol + 7 DMSO		
A. mangium	- kriopreservasi	-sukrosa(2-10%) /glukosa(8-10%) + 2 mg/l BAP	3,6,9	DMSO (10-15)/ glycerol (15) +sukrosa(2-10) /glukosa(8-10)	1(24°C-->-5°C -->0,3 1(24°C-->-5°C -->1 0,2(24°C-->-5°C -->0,3 0,3(24°C-->-5°C -->1	-30,-40,-196,-30&-196
	- vitrifikasi	-sorbitol(9%) +2 mg/l BAP+ 0,5 mg/l NAA	2	22 glycerol + 17/20 ethylene glycol + 17/20 propylene glycol + 7/15 DMSO		
	- vitrifikasi	-sorbitol(9%) +2 mg/l BAP+	2	22 glycerol + 15 ethylene glycol + 15 propylene glycol + 7 DMSO		

Jenis	Teknik	Media	Lama ink. prafreez. (hari)	Larutan krioprotektan/vitrifikasi(%)	Laju pendinginan (°C/menit)	Suhu terminal (°C)
P. pinnata	- kriopreservasi	-sukrosa (10%) + 2 mg/l BAP	6	DMSO (15) + sukrosa (10)	1(24°C-->-5°C --->0,3	-10, -20
		-sukrosa (10%) + 2 mg/l BAP + 300 mg/l asam sitrat	6	DMSO (15) + sukrosa (10) + asam sitrat (300)	1(24°C-->-5°C --->0,3	-10, -20
Nephelium lappaceum (rambutan)	- kriopreservasi	-sukrosa (10%) + 2 mg/l BAP	6	DMSO (15) + sukrosa (10)	1(24°C-->-5°C --->0,3	-30

Ket : a. dienkapsulasi dalam 2% natrium alginat sebelum tunas pucuk diinkubasi

b. dienkapsulasi dalam 2% natrium alginat sebelum tunas pucuk direndam dalam larutan krioprotektan/vitrifikasi

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Penghambatan pertumbuhan

Preservasi *in vitro* tanaman kehutanan berhasil dilakukan dengan metode slow growth yaitu membiakkan pada media yang mengandung sumber karbohidrat konsentrasi tinggi dan zat pengatur tumbuh.

Media yang dicoba untuk menghambat tunas pucuk *P. falcataria* yaitu :

- MS yang mengandung 2,0; 4,0; 6,0 % sukrosa
- MS yang mengandung 2,0; 4,0; 6,0 % sorbitol

Hasil terbaik diperoleh bila menggunakan 6% sorbitol karena pada media tersebut tinggi tunas pucuk terhambat 1/3 kali tetapi penampakan tetap segar dan tetap bertahan pada media tersebut selama 8½ bulan tanpa subkultur.

Penelitian untuk menghambat pertumbuhan tunas pucuk *Acacia mangium* tidak dilakukan pada tahun 1994/1995 karena sudah dilakukan tahun sebelumnya. Sedangkan jenis *Pometia pinnata* dan *Peronema canescens* tidak dicoba karena belum berhasil dibiakkan secara *in vitro* disebabkan kandungan

phenol yang tinggi.

2. Kriopreservasi

Preservasi tanaman dalam nitrogen cair maupun pada suhu rendah menggunakan metode kriopreservasi pada ketiga jenis tanaman sampai -30°C belum memberikan hasil yang memuaskan.

Namun demikian, dari berbagai perlakuan yang telah dicoba dapat disimpulkan metode yang terbaik bagi jenis tanaman tertentu :

A. *A. mangium*

- kriopreservasi : * media MS + 10% glukosa + 2 mg/l BAP
(hari ke-30 : * lama inkubasi : 6 hari
20% bertahan * krioprotektan : 15% DMSO
hidup) * laju pendinginan : $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$
($24^{\circ}\text{C} \rightarrow -5^{\circ}\text{C}$)
 $0,3^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ ($-5^{\circ}\text{C} \rightarrow -30^{\circ}\text{C}$)
* temperatur akhir : -30°C

B. *P. falcataria*

- kriopreservasi : * media MS + 6% glukosa + 2 mg/l BAP
(hari ke-6 : * lama inkubasi : 3 hari
100% terlihat * krioprotektan : 15% DMSO
hijau) * laju pendinginan : $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$
($24^{\circ}\text{C} \rightarrow -5^{\circ}\text{C}$)
 $0,3^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ ($-5^{\circ}\text{C} \rightarrow -30^{\circ}\text{C}$)
* temperatur akhir : -30°C

3. Vitrifikasi

Hasil terbaik vitrifikasi *A. mangium* dan *P. falcataria* adalah sebagai berikut :

A. *A. mangium*

- vitrifikasi : * media MS + 9% sorbitol + 2 mg/l BAP
(hari ke-30 : * lama inkubasi : 2 hari
40% bertahan * larutan vitrifikasi : 22% glycerol +

hidup:berkalus) 15% ethylene glycol + 15% propylene glycol +7% DMSO

B. *P. falcataria*

- vitrifikasi : * media : MS + sorbitol (9%) + 2 mg/l (hari ke-8 : BAP + 0,5 mg/l NAA
- 100% terlihat * lama inkubasi : 4 hari
- hijau) * larutan vitrifikasi : 22% glycerol + 20% ethylene glycol + 20% propylene glycol + 15% DMSO

Beberapa faktor penyebab belum berhasilnya penyimpanan dalam nitrogen cair, antara lain :

1. larutan krioprotektan untuk kedua metode yang belum sesuai
2. laju pendinginan dan metode "thawing" pada metode krio-preservasi belum sesuai
3. lama inkubasi prafreezing belum optimal
4. kandungan phenol yang tinggi
5. ketersediaan material

Usaha lain untuk meningkatkan prosentase daya hidup dilakukan dengan mengenkapsulasi tunas pucuk dalam 2% natrium alginat. Hasil yang diperoleh belum memuaskan, karena konsentrasi larutan krioprotektan/vitrifikasi yang dicoba masih rendah.

Pada *P. pinnata*, selain pencoklatan jaringan yang parah akibat pembekuan, faktor ketersediaan benih yang terbatas menyebabkan kriopreservasi tunas pucuk belum berhasil. Seperti halnya *P. pinnata* (matoa), rambutan (*N. lappaceum*) juga mengalami pencoklatan jaringan walaupun tidak separah matoa.

KESIMPULAN

1. Teknik "slow growth" dapat digunakan untuk preservasi *in vitro* karena tunas pucuk *P. falcataria* dapat disimpan selama 8½ bulan tanpa sub kultur.
2. Walaupun preservasi dalam nitrogen cair belum berhasil, hasil positif adalah:
 - Kriopreservasi : terdapat persamaan antara *P. falcataria* dan *A. mangium*, penambahan glukosa hingga 10% memberikan hasil lebih baik setelah pembekuan tunas hingga suhu -30°C dibanding sukrosa.
 - Vitrifikasi :
 - * terdapat persamaan antara *P. falcataria* dan *A. mangium* yaitu larutan vitrifikasi yang tanpa mengandung Bovine Serum Albumin.
 - * terdapat perbedaan antara *P. falcataria* dan *A. mangium* yaitu *P. falcataria* membutuhkan larutan vitrifikasi konsentrasi lebih tinggi yang pada *A. mangium* memberikan pengaruh negatif.
3. Berdasarkan hasil yang diperoleh, penelitian kriopreservasi dan vitrifikasi masih perlu penelitian lanjutan terutama untuk *P. pinnata*.
4. Baik pada kriopreservasi maupun vitrifikasi, enkapsulasi masih memerlukan konsentrasi tinggi larutan krioprotektan/vitrifikasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bajaj, Y.P.S. 1976. Gene preservation through freeze storage of plant cell, tissue and organ culture. *Acta Hort.* 63 : 75-78.
- Kartha, K.K., Leung, N.L. and Pahl K. 1980. Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*: 481-484.

Sudarmonowati, E. dan G.G. Henshaw. 1992. Pengaruh perlakuan awal dan krioprotektan terhadap daya hidup embrio somatik ketela pohon yang dibekukan. Prosiding seminar hasil penelitian dan pengembangan bioteknologi, Bogor 11-12 Pebruari : 181-191.