

**PENELITIAN SUMBERDAYA HAYATI (T.U. 01. 6316)  
B. TEKNIK KONSERVASI *IN VITRO* SKALA LAB.**

E. Sudarmonowati, S. Adisoemarto, U. Soetisna,  
D. Priadi, S. Rahmawati, Rosmithayani, Y. Andayani,  
E.S. Mulyaningsih, S. J. Rijadi, N. Taryana, D. Gozali,  
M. Abdurochim, dan S. Toha

**ABSTRAK**

Berbagai faktor yang mempengaruhi daya hidup tunas pucuk *in vitro* *Acacia mangium*, *Paraserianthes falcataria*, embrio zigotik *Pometia pinnata*, *Litchi chinensis*, *Euphoria longan* dan *Shorea pinanga* setelah prakultur atau tanpa pra kultur pada media MS yang mengandung sukrosa (0,3 M) dan pencelupan dalam nitrogen cair diteliti untuk memperoleh metoda yang terbaik. Dua jenis metoda yaitu enkapsulasi - dehidrasi dan vitrifikasi dibandingkan untuk preservasi tunas pucuk, sedangkan metoda vitrifikasi dan kombinasi vitrifikasi- dehidrasi dibandingkan untuk preservasi embrio zigotik secara *in vitro*. Selain periode prakultur (10, 20 dan 30 hari), juga dibandingkan lamanya perendaman dalam larutan vitrifikasi (1-18 jam), konsentrasi larutan vitrifikasi, metoda dehidrasi (kering angin dan dengan silikagel dengan periode 1-6 jam) dan saat pembukaan kapsul (1 dan 3 hari setelah pencelupan dalam nitrogen cair). Hasil terbaik yang diperoleh (70% survival) adalah preservasi tunas pucuk *A. mangium* dengan metoda enkapsulasi-dehidrasi yang telah dikeringkan dengan silikagel selama 6 jam dan kapsul dibuka setelah 3 hari. Embrio zigotik yang berhasil hidup setelah pencelupan dalam nitrogen cair hanya embrio *L. chinensis* dengan metode vitrifikasi-dehidrasi. Uji regenerasi embrio somatik *P. pinnata* yang telah diberi perlakuan vitrifikasi dan telah disimpan selama 3-6 bulan dalam nitrogen cair juga dilakukan. Penelitian awal preservasi meristem dan anter belum memberikan hasil yang baik karena masih banyak faktor yang perlu diteliti. Selain preservasi *in vitro*, dilakukan pula penelitian penunjang untuk menentukan kadar air kritis benih *Swietenia macrophylla*, *Manilkara kauki*, *Pometia pinnata* dan *Shorea pinanga* serta penyimpanannya pada suhu 20°C, -20°C dan -80°C.

KATA KUNCI : Preservasi, enkapsulasi-dehidrasi, vitrifikasi, survival, embrio somatik

**PENDAHULUAN**

Program konservasi baik *in situ* maupun *ex situ* memegang peranan penting dalam keberhasilan pelestarian plasma nutfah. Konservasi *ex situ* mempunyai beberapa kelebihan karena tidak memerlukan tempat seluas lahan untuk konservasi *in situ*, penyediaan benih di luar musim terutama benih rekalsitran. Selain itu, satu teknik konservasi *ex situ* yaitu preservasi *in vitro* mempunyai beberapa keuntungan lain yaitu dapat menyimpan bahan tanaman species yang tidak menghasilkan biji atau menghasilkan biji dalam jumlah sedikit atau steril, species yang hanya dapat dibiakkan dengan bahan vegetatif seperti umbi atau "bulb", dapat menghasilkan tanaman bebas virus dan terhindar dari bencana alam seperti banjir, musim kemarau ang panjang serta serangan hama dan penyakit tanaman. Mengingat setiap species

tanaman dan setiap jenis bahan tanaman yang disimpan memerlukan penanganan berbeda, maka diperlukan penelitian agar usaha konservasi *ex situ* dapat berhasil.

Keberhasilan konservasi benih dan konservasi *in vitro* ditentukan oleh kadar air kritis yang langsung berhubungan dengan cara pengeringan. Mengingat kadar air setiap jenis adalah berbeda dan sangat tergantung pada tingkat kemasakan benih maka penelitian kadar air kritis sangat vital. Penelitian yang sama juga diperlukan untuk dapat menyimpan materi *in vitro*, hanya cara pengeringannya berbeda karena dehidrasi biasanya dilakukan dengan penambahan komponen osmotik seperti sukrosa, glukosa atau sorbitol konsentrasi tinggi pada medium prakultur. Mengingat materi yang akan disimpan berbeda-beda yaitu tunas pucuk, embrio zigotik, embrio somatik dan kalus embriogenik, banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan preservasi yang perlu diteliti.

Penelitian yang dilakukan menyangkut dua aspek yaitu (1) preservasi *in vitro* species yang berbiji rekalsitran dan species yang sudah berhasil propagasi *in vitro*-nya sehingga tidak diperlukan subkultur, lebih ekonomis dan mengurangi jumlah materi yang terkontaminasi akibat subkultur rutin; (2) penentuan kadar air kritis dan konservasi benih.

Teknik preservasi yang digunakan adalah teknik preservasi pada suhu serendah mungkin hingga ultra rendah ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) untuk penyimpanan jangka panjang dengan metoda vitrifikasi dan enkapsulasi-dehidrasi. Keberhasilan kriopreservasi pada tanaman kehutanan masih rendah, itupun umumnya tanaman kehutanan dari daerah bersuhu dingin. Beberapa yang sudah berhasil antara lain kriopreservasi pada kalus *Populus euamericana* ( Sakai dan Sugawara, 1973) dan tunas Scot pine (Kuoksa dan Hohtola, 1991). Preservasi kalus embriogenik pada tanaman kehutanan sudah berhasil pada tanaman daerah bersuhu dingin yaitu *Picea abies* dan *Pinus taeda* ( Gupta et. al, 1987).

Tujuan penelitian adalah mengembangkan teknik preservasi *in vitro* tanaman untuk menunjang program pelestarian plasma nutfah.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### I. *Preservasi in vitro*

#### a. Bahan tanaman

Embrio zigotik *S. pinanga*, kelengkeng (*E. longan*), leci (*L. chinensis*) dan matoa (*P. pinnata*), tunas pucuk *in vitro* mangium (*Acacia mangium*) dan sengon (*Paraserianthes falcataria*) yang dibiakkan dalam media MS yang mengandung 2 mg/L BAP, dan embrio somatik *P. pinnata* yang dibiakkan pada media WPM yang mengandung 1 mg/L kinetin dan 0,01 mg/L NAA. Meristem sengon diisolasi dari tunas pucuk planlet yang dibiakkan pada media MS tanpa tanpa hormon. Anter rambutan dan kelengkeng tidak diprakultur tetapi langsung digerus dan didehidrasi.

#### b. Prosedur sterilisasi

Secara umum sterilisasi embrio zigotik dari jenis-jenis tanaman yang dicoba adalah sama yaitu dikocok dalam 10% Difolatan selama 10 menit sebelum disterilisasi dalam 0,1 %  $\text{HgCl}_2$  selama 5 menit. Untuk benih mangium dan sengon, sterilisasi dilakukan dengan cara mengocok benih dalam 0,3%  $\text{HgCl}_2$  selama 10 menit. Sterilisasi anter rambutan dan kelengkeng dilakukan dengan 0,03%  $\text{HgCl}_2$  selama 7 menit. Setelah disterilisasi semua bahan tanaman dibilas dengan aquades steril sebanyak tiga kali.

#### c. Prosedur enkapsulasi

Tunas pucuk setelah prakultur dicelupkan dalam 2 % natrium alginat sebelum dimasukkan ke dalam larutan 100mM  $\text{CaCl}_2$  sehingga terbentuk butiran-butiran. Tunas yang sudah dienkapsulasi tersebut direndam dalam larutan krioprotektan sebelum pembekuan.

#### d. Kegiatan penelitian preservasi *in vitro* mencakup prosedur vitrifikasi dan enkapsulasi - dehidrasi periode 1996/1997 dirangkum pada Tabel 1.

#### e. Prosedur regenerasi

Setelah pencelupan/penyimpanan dalam nitrogen cair, eksplan dicairkan ("thawed") dengan cara merendam dalam "water bath" pada suhu 40°C selama 20 menit. Eksplan kemudian dibiakkan pada media regenerasi yang sesuai.

Tabel 1. Rangkuman kegiatan preservasi in vitro periode 1996/1997

Jenis Tanaman	Prosedur	Enkapsulasi beads	larutan vitrifikasi	Periode perendaman	Metode dehidrasi	Praperlakuan
<i>A. mangium</i>	enkapsulasi - dehidrasi Pembukaan kapsul : a. 1 hari b. 3 hari	MS + 3% Na Alg + 0,3 M Sukrosa	0,8 M sukrosa + 1,0 M gliserol	18 jam	- air drying 3 Jam 5 Jam - silika gel 4 jam 6 jam	MS + 0,3 M sukrosa (1 hari)
	vitrifikasi-dehidrasi		(15%, 20%, 30%) gliserol + (7,5, 10, 15%) etilen glikol + (7,5, 10, 15%) DMSO + 0, 2, 0,3 dan 0,4 M) sukrosa	10 menit 15 menit 20 menit 25 menit 30 menit		MS + 0,3 M sukrosa (10, 20, 30 hari)
<i>P. falcataria</i>	enkapsulasi - dehidrasi Pembukaan kapsul : a. 1 hari b. 3 hari	MS + 3% Na Alg + 0,3 M Sukrosa		18 jam	- air drying 3,4,5,6 Jam - silika gel 3,4,5,6 jam	MS + 0,3 M sukrosa
	vitrifikasi		30% gliserol +15% etilen glikol +15% DMSO +0,4 M sukrosa	10 menit 15 menit 20 menit		MS + 0,7 M sukrosa
	kriopreservasi meristem		30% gliserol +15% etilen glikol +15% DMSO +0,4 M sukrosa	2 jam		
<i>L. chinensis</i>	vitrifikasi		0,8 M sukrosa + 1,0 M gliserol	18 jam	- air drying 3 Jam 5 Jam - silika gel 4 jam 6 jam	MS + 0,3 M sukrosa (6 hari)
<i>S. pinanga</i>	vitrifikasi-dehidrasi		0,8 M sukrosa + 1,0 M gliserol	18 jam	air drying 2 dan 4 jam	

(lanjutan) :

	Prosedur	Enkapsulasi beads	larutan vitrifikasi	Periode perendaman	metode dehidrasi	Praperlakuan
	vitrifikasi embrio zigotik		0,8 M sukrosa + 1,0 M glycerol	1, 4, 18 jam	- Air drying 2 dan 4 jam - Silikagel 2 dan 4 jam	MS + 0,3 M sukrosa (2, 5 hari)
	vitrifikasi embrio somatik dan kalus embriogenik		30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO	10 menit		MS + 0,4 M sukrosa (1 hari)
			40 % glycerol + 40% sukrosa			
	Enkapsulasi dehidrasi tunas pucuk	MS+ 3% NaAlg + 0,3M sukrosa + 200 ppm as. sitrat	0,8 M sukrosa + 1,0 M glycerol + 200 ppm as sitrat	18 jam	- Air drying 0, 2 dan 4 jam	
	vitrifikasi anter				- Air drying 2 jam	
	vitrifikasi-dehidrasi embrio		0,8 M sukrosa + 0,1 M glycerol +200ppm asam sitrat	18 jam	- Air drying 1,2,3,5 Jam - Silika gel 1,2,4,6 jam	MS + 0.3 M sukrosa (7 hari)
	vitrifikasi-Anter				- Air drying 0, 1/2 , 1, 2 Jam	

### Konservasi benih

#### Benih benih tanaman

Benih benih tanaman yang digunakan adalah mahoni (*Swietenia macrophylla*),

*Shorea pinanga*, matoa (*P. pinnata*), sawo kecil (*Manilkara kauki*) dan rambutan.

#### Sterilisasi benih

Sebelum perlakuan lebih lanjut, semua benih atau aksis embrio dikocok dalam 2% Delsen selama 15 menit untuk mencegah serangan jamur selama penyimpanan dan saat uji germinasi.

#### Prosedur pengeringan

Benih dikeringkan berdasarkan rekomendasi dari IPGRI/DANIDA yaitu dengan mencampur langsung benih dengan silika gel dengan perbandingan 1:1 atau 1:2

dalam kantong plastik yang tertutup rapat. Lamanya pengeringan tergantung pada kadar air target yang diinginkan. Perhitungannya dilakukan dengan menggunakan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Berat benih (gr) pada kadar air target} = \frac{100 - \text{kadar air awal}}{100 - \text{kadar air target}} \times \text{berat benih awal (gr)}$$

#### L Pengukuran kadar air

Kadar air diukur dengan menggunakan metode oven berdasarkan peraturan yang dikeluarkan oleh ISTA (International Seed Testing Association).

#### M Prosedur konservasi

Benih atau aksis embrio direndam dalam larutan krioprotektan selama dua jam sebelum didinginkan secara bertahap dengan laju pendinginan  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{menit}$  hingga mencapai suhu akhir yang diinginkan.

#### N Prosedur germinasi

Setelah pendinginan sampai suhu tertentu (umumnya hingga  $-30^{\circ}\text{C}$ ), bahan tanaman direndam dalam water bath ( $40^{\circ}\text{C}$ ) selama 20 menit (thawing). Selanjutnya dibilas dengan aquades steril dan dikecambahkan dalam cawan petri steril dengan metode UDK (Uji Di atas Kertas)

#### O Kegiatan penelitian konservasi benih periode 1996/1997 dirangkum pada

Tabel 2.

Tabel 2. Rangkuman kegiatan penelitian konservasi benih periode 1996/1997

No.	Jenis	Kegiatan
1.	<i>Swietenia macrophylla</i>	- Pengaruh kadar air setelah pengeringan pada perkecambahan - Penyimpanan benih utuh dan aksis embrio pada berbagai tingkat kadar air pada suhu $15^{\circ}\text{C}$ dan $-20^{\circ}\text{C}$ . - Konservasi benih utuh dan embrio aksis dengan menggunakan metode pendinginan lambat dan vitrifikasi
2.	<i>Shorea pinanga</i>	- Pengaruh pengeringan benih hingga beberapa tingkat kadar air terhadap perkecambahan
3.	<i>Manilkara kauki</i>	- Penentuan kadar air kritis
4.	<i>Pometia pinnata</i>	- Pengaruh kadar air dan suhu simpan
5.	<i>Nephelium lappaceum</i>	- Konservasi aksis embrio dengan metoda pendinginan lambat

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### I. Preservasi In vitro

#### 1. Preservasi in vitro tunas pucuk *A. mangium* dan *P. falcataria*

Tabel 3 : Pengaruh lamanya prakultur dan lamanya perendaman dalam larutan vitrifikasi terhadap daya hidup tunas pucuk mangium dan sengon

Prakultur (hari)	Lama perendaman (menit)	Survival (%)	
		Mangium	Sengon
10	-	100	100
	- , N2 cair	0	0
	10	80	90
	10 , N2 cair	0	0
	15	60	100
	15, N2 cair	0	0
	20	30	90
	20, N2 cair	0	50
20	-	100	100
	- , N2 cair	0	0
	10	100	60
	10 , N2 cair	0	0
	15	50	50
	15, N2 cair	0	0
	20	50	50
	20, N2 cair	0	0
30	-	100	100
	- , N2 cair	0	10
	10	80	100
	10 , N2 cair	0	10
	15	70	100
	15, N2 cair	0	0
	20	70	100
	20, N2 cair	0	0

Keterangan : - Jumlah sampel masing-masing 10  
 - Media regenerasi MS + 2 mg/l BAP

Tabel 4 : Pengaruh lamanya perendaman dalam larutan vitrifikasi terhadap daya hidup tunas pucuk sengon

Lama Perendaman (menit)	Survival (%)
-	100
-, N2 cair	0
10	90
10, N2 cair	0
15	100
15, N2 cair	0
20	90
20, N2 cair	50
25	100
25, N2 cair	0
30	70
30, N2 cair	0

Keterangan : Lama prakultur 1 hari

Hasilnya menunjukkan bahwa kriopreservasi tunas pucuk *A. mangium* dengan metoda enkapsulasi - dehidrasi lebih baik dibandingkan dengan metode vitrifikasi. Pada metoda vitrifikasi, tunas pucuk *A. mangium* yang diprakultur selama 10, 20 dan 30 hari pada media MS + 0,3 sukrosa tidak ada yang berhasil hidup setelah dicelupkan dalam nitrogen cair. Metoda ini perlu dicoba lagi dengan cara mengubah komposisi larutan vitrifikasi dan lama perendaman dalam larutan tersebut, karena diduga larutan vitrifikasi yang digunakan (30% gliserol + 15% Etilen glikol + 15% DMSO + 0,4 M sukrosa) untuk merendam tunas pucuk *A. mangium* selama 10, 15 dan 20 menit tidak sesuai. Berbeda dengan mangium, pada sengon metoda vitrifikasi yang dicoba dapat memberikan 50% survival (hasil pengamatan umur 3 bulan setelah pencelupan dalam nitrogen cair) walaupun tunas yang berhasil tersebut lebih banyak yang berkalus (belum menghasilkan tunas baru). Hasil ini diperoleh dengan cara membiakkan tunas pucuk sengon pada media MS + 0,3 M sukrosa selama 10 hari dan merendamnya dalam larutan vitrifikasi selama 20 menit (Tabel 3 dan 4).



Tabel 5 : Pengaruh metoda dan lamanya dehidrasi serta pembukaan kapsul terhadap daya hidup tunas pucuk mangium

Pengeringan		Pembukaan kapsul (hari)	Survival (%)
Metoda	Lamanya (Jam)		
-	-	1	100
		3	100
		1	0
		3	0
Kering angin	3	1	100
		3	100
	3, N2 cair	1	0
		3	10
	5	1	100
		3	100
5, N2 cair	1	20	
	3	40	
Silikagel	4	1	100
		3	100
	4, N2 cair	1	0
		3	0
	6	1	100
		3	100
6, N2 cair	1	0	
	3	70	

Keterangan : Jumlah sampel masing-masing 10

Tabel 6 : Pengaruh metoda dan lamanya dehidrasi serta pembukaan kapsul terhadap daya hidup tunas sengon

Pengeringan		Pembukaan kapsul (hari)	Survival (%)
Metoda	Lamanya (Jam)		
-	-	1	100
		3	100
		1	0
		3	0
Kering angin	3	1	100
		3	100
	3, N2 cair	1	0
		3	0
	4	1	100
		3	100
4, N2 cair	1	0	
	3	0	

Tabel 6 (lanjutan)

Pengeringan		Pembukaan kapsul (hari)	Survival (%)
Metoda	Lamanya (Jam)		
	5	1	100
		3	100
	5, N2 cair	1	10
		3	0
	6	1	100
		3	84,6
6, N2 cair	1	0	
	3	0	
Silikagel	3	1	100
		3	100
	3, N2 cair	1	0
		3	0
	4	1	100
		3	84,6
	4, N2 cair	1	0
		3	0
	5	1	100
		3	76,9
	5, N2 cair	1	0
		3	38,4
6	1	100	
	3	84,6	
6, N2 cair	1	0	
	3	0	

Keterangan : Jumlah sampel masing-masing 13

Dengan metoda enkapsulasi-dehidrasi, sebaliknya tunas pucuk *A. mangium* dapat bertahan hidup setelah pencelupan dalam nitrogen cair. Hasil terbaik (70% survival) diperoleh dengan cara mengeringkan dengan silikagel selama 6 jam dan kapsul dibuka 3 hari setelah pembekuan (Tabel 5). Dehidrasi dengan cara kering angin selama 5 jam menghasilkan persentase survival yang lebih rendah (40%). Tunas pucuk tidak ada yang bertahan hidup bila kapsul dibuka hanya 1 hari setelah pembekuan, sedangkan tunas pucuk sengon dapat bertahan hidup walaupun hanya 10% yaitu yang dikeringanginkan selama 5 jam (Tabel 6).

## 2. Preservasi meristem sengon (*P. falcataria*)

Preservasi meristem dengan teknik "droplets" yang dicoba belum menghasilkan meristem yang bertahan hidup setelah pencelupan dalam nitrogen cair.

Hal ini diduga karena komposisi dan konsentrasi larutan krioprotektan, lamanya perendaman dan suhu "thawing" belum tepat?.

### **3. Preservasi *in vitro* embrio leci (*Litchi sinensis*)**

Dari semua perlakuan vitrifikasi yang dicoba, hasil terbaik (50% survival) diperoleh dengan cara dehidrasi dengan silikagel selama 4 jam. Embrio yang bertahan hidup itupun hanya membentuk kalus dan belum dapat diregenerasikan menjadi tunas. Penelitian yang merupakan model bagi matoa (*P. pinnata*) ini tidak dapat dilanjutkan untuk memperoleh hasil yang lebih baik karena keterbatasan buah yang tersedia.

### **4. Preservasi *in vitro* anter dan embrio lengkung (*Euphoria longan*)**

Seperti halnya leci, preservasi kelengkeng juga merupakan model untuk jenis benih rekalsitran seperti matoa. Belum ada anter dan embrio kelengkeng yang berhasil hidup setelah pencelupan dalam dengan metoda vitrifikasi - dehidrasi karena semua embrio menjadi coklat. Pencoklatan jaringan setelah pencelupan dalam nitrogen cair, masih merupakan masalah. Penelitian dengan metoda lain tidak dapat dilakukan karena keterbatasan material.

### **5. Preservasi *in vitro* kalus embriogenik, embrio somatik, embrio zigotik dan tunas pucuk matoa (*P. pinnata*)**

Berhubung materialnya terbatas, metoda yang dapat dicoba untuk preservasi embrio zigotik matoa adalah vitrifikasi - dehidrasi dengan silikagel atau kering angin 2 atau 4 jambaik tanpa prakultur, 2 atau 5 hari prakultur (Tabel 7). Walaupun satu hari setelah pencelupan dalam nitrogen cair aksis embrio matoa masih terlihat kehijauan, namun masih perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut. Umumnya embrio matoa sudah terlihat coklat saat dehidrasi. Oleh karena itu untuk mengurangi pencoklatan, lamanya perendaman dalam larutan vitrifikasi dipersingkat dan ke dalam larutan tersebut ditambahkan 20 ppm asam sitrat. Namun, ternyata perlakuan tersebut tidak terlalu berpengaruh.

Uji regenerasi embrio somatik dan kalus embriogenik matoa yang disimpan tiga bulan dalam nitrogen cair menunjukkan bahwa 70-100% kalus embriogenik dan 30-70% embrio-somatik (tergantung jenis larutan yang digunakan) dapat hidup dan

menghasilkan embrio somatik baru. Hasil uji regenerasi setelah penyimpanan enam bulan dalam nitrogen cair masih dalam pengamatan. Tunas pucuk matao yang dienkapsulasi tidak ada yang bertahan hidup setelah dehidrasi dan setelah pencelupan dalam nitrogen cair. Hal ini disebabkan karena tunas pucuk mengandung komponen fenol lebih tinggi dibandingkan dengan embrio, tunas pucuk tersebut sudah berubah coklat sebelum selesai dehidrasi.

Tabel 7 : Preservasi tunas pucuk matao dengan metoda enkapsulasi dehidrasi

Prosedur	Pengeringan		Lama perendaman (jam)	Survival (%)	
	Metoda	Lama (jam)			
Enkapsulasi	kering angin	-	2	0	
		-, N2 cair	2	0	
		2	2	0	
		2, N2 cair	2	0	
	silikagel	-	2	7.6	
		-, N2 cair	2	0	
		2	2	7.6	
		2, N2 cair	2	0	
Tanpa enkapsulasi	kering angin	-	18	0	
		-, N2 cair	18	0	
		2	18	0	
		2, N2 cair	18	0	
			4	18	0
			4, N2cair	18	0

- Keterangan :
- n = 13.
  - pembukaan kapsul 3 hari
  - pencoklatan terjadi saat pengeringan

## 6. Preservasi anter rambutan (*Nephelium lappaceum*)

Seperti halnya anter kelengkeng, anter rambutan juga belum berhasil hidup setelah perendaman dalam nitrogen cair. Beberapa faktor yang diduga berpengaruh antara lain adalah komposisi media regenerasi yang belum sesuai.

## 7. Preservasi *in vitro* embrio *Shorea pinanga*

Dengan metoda dehidrasi (tanpa perendaman dalam larutan vitrifikasi) selama 2 atau 4 jam kering angin atau dengan silikagel dan vitrifikasi-dehidrasi (perendaman dalam larutan vitrifikasi selama 1 atau 18 jam), tidak ada embrio *S. pinanga* yang hidup setelah pencelupan dalam nitrogen cair. Diduga lamanya dehidrasi dan perendaman dalam larutan vitrifikasi belum cukup, sehingga kadar airnya masih tinggi. Penelitian lebih lanjut belum dapat dilakukan karena keterbatasan materi.

## II. Penentuan Kadar Air Kritis dan Preservasi Benih

### 1. Mahoni (*Swietenia macrophylla*)

Penelitian yang dilakukan mencakup pengeringan dan penyimpanan benih utuh dan aksis embrio. Pengeringan benih utuh menggunakan silikagel 1:1 untuk mahoni yang berkadar air awal dengan rata-rata  $34,7\% \pm 4,8\%$  menjadi 6% ternyata masih dapat berkecambah hingga 72%. Penyimpanan benih terbaik dengan kadar air 6-9% adalah pada suhu 24°C (ruang) karena 30-36% benih dapat berkecambah setelah disimpan 1 bulan dan 6-12% setelah disimpan 6 bulan (Tabel 8). Pada suhu -20°C hanya 6% benih utuh yang dapat berkecambah setelah disimpan 1 bulan, dan benih mati semua setelah 6 bulan. Berhubung benih tidak dapat bertahan hidup setelah disimpan 6 bulan pada suhu -20°C, maka diduga benih mahoni tergolong kelompok benih intermediate.

Tabel 8 : Hasil penyimpanan benih mahoni pada 2 tingkat suhu

Perlakuan	0 Bulan		1 Bulan		3 Bulan		6 Bulan	
	KA (%)	DB (%)	KA (%)	DB (%)	KA (%)	DB (%)	KA (%)	DB (%)
Suhu Ruang (24 C)								
KA 9%	10.4	66	9.2	30	5.1	36	2.8	12
KA 6%	7.6	71	6.4	36	6.5	45	2.3	6
Suhu -20 C								
KA 9%	9.5	9.5	11.8	26	7.8	4	7.5	0
KA 6%	10.4	10.4	8.4	6	11	16	10.6	0

Dibandingkan dengan perendaman dalam 5% DMSO atau kombinasi 5% DMSO + 5% gliserol + 5% sukrosa selama 2 jam, perendaman dalam kombinasi 0,8M gliserol dan 1 M sukrosa selama 2 jam sebelum disimpan pada suhu -80°C selama 24 jam, meningkat lebih baik karena persentase benih utuh yang dapat berkecambah menjadi 22,9% dari 2,9%. Tidak seperti benih utuh, aksis embrio benih mahoni tidak dapat bertahan hidup setelah penyimpanan pada suhu -20°C. Viabilitas aksis embrio yang disimpan pada suhu ruang juga sangat rendah.

### 2. *Shorea pinanga*

Pengujian kadar air menunjukkan bahwa kadar air awal benih adalah 53,1% dengan daya berkecambah awal 76,7%. Penelitian penentuan kadar air kritis yang

dilakukan menunjukkan bahwa pengeringan benih *S. pinanga* dengan silikagel (perbandingan 1:1) hingga lebih 30% dari kadar air awal menyebabkan benih tidak dapat berkecambah (Tabel 9). Dengan demikian penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memperoleh metoda pengeringan yang lebih baik. Pengukuran kadar air berdasarkan warna sayap coklat, coklat muda dan coklat kekuningan juga dilakukan dengan kadar air awal masing-masing 77,5; 84,7; dan 86,2%, akan tetapi setelah kadar airnya diturunkan menjadi 25-37% viabilitas benih menjadi 0%.

Tabel 9 : Pengeringan *Shorea pinanga*

KA Kontrol (%)	DB
53.6	93.3
65.04	70
62.6	76.7
KA Pengeringan (%)	DB
35.9	0
31.7	0
21.8	0

### 3. Sawo kecil (*Manilkara kauki*)

Pengeringan hingga kadar air 7,6-12,5% dengan silika gel selama 15-24 jam mengakibatkan viabilitas benih menurun dari 50% hingga 10-20% (Tabel 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa sawo kecil tergolong benih rekalsitran, yang apabila kadar airnya diturunkan lebih dari 10% dari kadar air awal, maka viabilitasnya akan menurun drastis. Hasil lainnya menunjukkan bahwa uji pewarnaan dengan tetrazolium tidak dapat mewakili persentase daya berkecambah yang sebenarnya. Prosedur pengeringan masih perlu disempurnakan hingga diperoleh persentase viabilitas yang lebih tinggi.

Tabel 10 : Pengeringan dengan silikagel benih (2:1)

Lama pengeringan (jam)	Viabilitas (%)	KA (%)	TTZ (%)
0	50	40.83	100
3	50	33.81	100
15	20	12.48	100
24	10	7.6	94.4

Keterangan : Masing-masing perlakuan 50 benih axis embrio

#### 4. Matoa (*Pometia pinnata*)

Penelitian yang dilakukan adalah pengeringan untuk mencapai kadar air kritis dan pengeringan hingga kadar airnya turun 5-1% dari kadar air awal dan disimpan pada suhu ruang (24°C) atau pada suhu 14°C. Hasilnya menunjukkan bahwa viabilitas masih tinggi meskipun kadar air benih diturunkan 5-10% dari kadar air awal (40 + 2 %) dan kadar air kritisnya 20% (Tabel 11).

Tabel 11 menunjukkan bahwa penyimpanan benih yang kadar airnya telah diturunkan sebanyak 5-10% dapat bertahan hidup (36,7%) selama 12 minggu bila disimpan pada suhu 14 °C

Tabel 11 : Hasil Percobaan Pengeringan Matoa

Kadar Air Target (%)	x DHL ( $\mu$ s)	TTZ (%)	DB (%)	KA (%)
Non-Drying	296.5	92	100	35.5
30	1006	88	64	26.9
25	1452.5	72	46	27.4
20	1787.9	68	37	38.9
10	1980	0	0	37

Tabel 12 : Hasil penyimpanan benih matoa (Percobaan 2)

Perlakuan/ Parameter	KA (%)						DB (%)					
	minggu						minggu					
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10	12
Suhu 24 °C												
KA -5%	41.9	43.9	44.7	43.6	33	34	0	0	0	0	0	0
KA -10%	42.3	40.9	42.9	43.9	33	31	0	0	0	0	0	0
Suhu 14 °C												
KA -5%	48.8	42.3	44	43.6	42	37	26	4	23	7	0	80
KA -10%	44.2	41.6	42.6	33	41	31	30	5	0	27	0	0

#### 5. Rambutan (*Nephelium lappaceum*)

Uji penentuan kadar air kritis menunjukkan bahwa viabilitas benih menjadi 0% bila kadar air benih diturunkan hingga mencapai lebih rendah dari 20% (Tabel 13). Perendaman dalam 3 jenis komponen osmotikum yaitu 5% sukrosa, 5% gliserol

atau kombinasi keduanya selama 2, 10 dan 18 jam menunjukkan bahwa daya berkecambah tertinggi diperoleh bila benih direndam dalam 5% sukrosa selama 10 jam (Tabel 14). Penelitian lanjutan sedang dilakukan dengan mengkombinasikan perendaman dan penyimpanan pada suhu -10 hingga -40° C dan dalam nitrogen cair.

Tabel 13 : Laju penurunan kadar air pada asis benih rambutan

KA. Target (%)	Waktu (jam)	KA. Real (%)	DHL (s)	DB (%)	Kecepatan tumbuh/hari
Kontrol	-	35,0	208	100	27,921
30	2	28,6	276	100	23,353
25	4	24,1	630	83,3	13,081
20	6	21,5	929	60	7,43
15	10	14,1	1145	0	-
10	20	13,6	1084	0	-

Tabel 14 : Pengaruh penggunaan krioprotektan terhadap daya berkecambah aksis embrio benih rambutan

Jenis Protektan	DB. (%) setelah perendaman (jam)		
	2	10	18
Kontrol	30	30	30
Sukrosa 5%	30	86	50
Glukosa 5%	0	47	67
Glu. 5% + Suk. 5%	30	33	36

## KESIMPULAN

Metoda terbaik untuk preservasi tunas pucuk hasil multiplikasi *in vitro* berbeda-beda tergantung pada jenis tanamannya. Metoda terbaik untuk mangium adalah enkapsulasi-dehidrasi, sedangkan untuk preservasi tunas pucuk sengon adalah vitrifikasi. Preservasi meristem perlu dilanjutkan dengan meneliti variasi faktor yang diduga berpengaruh. Preservasi tunas pucuk matao belum berhasil karena sudah berubah coklat pada saat dehidrasi.

Preservasi kalus embriogenik dan embrio somatik matao dapat dilakukan dengan metoda vitrifikasi. Preservasi *in vitro* embrio zigotik jenis tanaman yang berbiji rekalsitran baru berhasil pada leci (walaupun baru menghasilkan kalus) yaitu



dengan metoda vitrifikasi- dehidrasi. Kendala utama penelitian untuk jenis ini dan kerabatnya adalah karena keterbatasan material penelitian dan tingginya kandungan fenol.

Preservasi anter tanaman kelengkeng dan rambutan belum berhasil karena kemungkinan tahap perkembangan anter dan media regenerasinya belum sesuai.

Kadar air kritis benih mahoni, *S. pinanga*, rambutan dan matoa sudah diketahui, namun penyimpanan benih-benih tersebut dalam jangka waktu lebih lama masih perlu diteliti.

## DAFTAR PUSTAKA

- Gupta, P.K., D.J. Durzan, B.J Finkle . 1987. Somatic polyembriogenesis in embryonic cell masses of *Picea abies* and *Pinus taeda* after thawing from liquid nitrogen. *Can. J. For. Res.* 17: 1130-1134.
- Kuoksa, T. and A. Hohtola. 1991. Freeze preservation of buds from Scot pine trees. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 27: 89-93
- Sakai, A and Y. Sugawara. 1973. Survival of poplar calus at super low temperatures after cold aclimation. *Plant and Cell Physiol.* 14: 1201-1204