

STUDI INHIBISI FORMASI KRISTAL ES DENGAN KRIOPROTEKTAN SUKROSA DAN GLICEROL

Nurkholis Hamidi

Teknik Mesin, Universitas Brawijaya
Jl. MT. Haryono 167 Malang 65145
E-mail : nurkholishamidi@yahoo.com

Abstract

A large number of investigations have been carried out to understand the mechanism of freezing and mechanical damages in biological materials. Harmfull ice crystal has been proposed to be a factor causing injury to biological materials during the freezing. How to control, eliminate, or prevent the intracellular ice formation become an important research topic in fundamental cryobiology. Microscopic observation of the freezing process of onion epidermis tissue have been made using a solidification stage in order to study the possibility ice crystal formation inhibition using glycerol and sucrose as a cryoprotectant. Experiments conducted under cooling rates of 40°C/min and 70°C/min. The results indicated that the increasing glycerol can depress the freezing initiation temperature. However, vitrification of onion cells only can be achieved when we used high concentration of cryoprotectant (more than 70%vol sucrose (0.8M)+30%vol glycerol) with relatively rapid freezing (more than 70°C/min).

Keywords : ice crystal inhibition, cryoprotectant, glycerol, sucrose

PENDAHULUAN

Pembekuan merupakan metode penyimpanan yang sangat penting dalam dunia kedokteran dan industri. Material biologi seperti sperma, sel telur, makanan, dan lainnya yang tersusun atas sel-sel hidup, akan mengalami perubahan dan kerusakan seiring dengan berjalannya waktu penyimpanan. Akan sangat bermanfaat sekali, apabila kita bisa menyimpannya dalam waktu yang lama sehingga bisa digunakan setiap saat diperlukan. Dalam beberapa kondisi, metode pembekuan telah menjadi metode yang efektif dalam menyimpan berbagai macam material biologi. Meski demikian, pembekuan sering mengakibatkan kerusakan yang bersifat irreversibel pada sel. Oleh karena itu, cara menjaga agar sel tetap hidup atau tidak rusak selama proses pembekuan merupakan tantangan yang harus dihadapi saat ini.

Menurut Mazur [1], ada dua mekanisme kerusakan sel selama proses pembekuan. Pertama, kerusakan sel dapat terjadi karena terbentuknya intraselular es dalam skala besar akibat proses pendinginan yang cepat. Air yang merupakan komponen utama dalam sel, akan mengalami pengembangan ketika

membeku sehingga merusak sel itu sendiri. Di sisi lain, kerusakan sel juga dapat terjadi pada saat pendinginan yang berlangsung sangat lambat. Pembekuan lambat dapat mengakibatkan terbentuknya ekstraselular es di luar sel. Terbentuknya ekstraselular es dapat memicu terjadinya transpor air dari dalam ke luar sel, sehingga sel mengalami dehidrasi dan pengerutan. Menurut penelitian yang lain [2][3][4], ekstraselular yang terbentuk dalam ukuran besar akan memberi tekanan pada sel, sehingga dapat merobek atau merusak membran sel.

Dalam rangka mencegah kerusakan sel akibat proses pembekuan, beberapa peneliti menyarankan pembekuan dilakukan pada kecepatan sangat tinggi (*ultra rapid freezing*) agar vitrifikasi air dapat tercapai. Vitrifikasi adalah fase transisi air dari bentuk cair menjadi fase amorf, atau non kristalin karena elevasi ekstrim dari larutan yang viskos selama pendinginan[5]. Metode ini umumnya dilakukan dengan cara mencelupkan sampel ke dalam nitrogen cair yang memiliki suhu yang sangat rendah, sekitar -196°C. Dengan metode ini terbentuknya kristal es yang bersifat merusak dapat dihindari. Akan tetapi,

metode ini hanya efektif untuk material-material dengan ukuran sangat kecil. Metode *ultra rapid freezing* sulit diterapkan pada material biologi dengan ukuran relatif besar, seperti organ dan jaringan [6]. Material biologi umumnya memiliki konduktivitas termal yang rendah sehingga transfer panas tidak bisa berlangsung dengan cepat. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa penerapan *rapid freezing* pada material dengan ukuran agak besar juga dapat menimbulkan *mechanical cracking*, terutama pada material dengan kandungan air yang tinggi dan rendah porositas [7] [8].

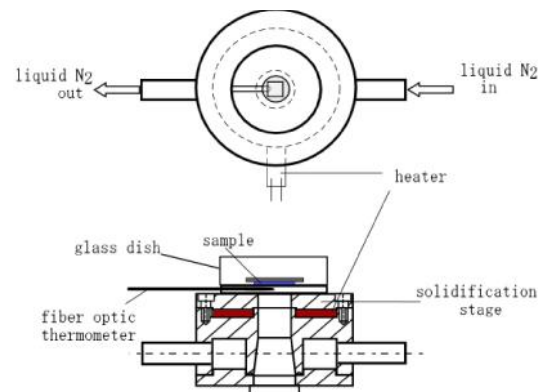
Dalam usaha mengatasi kesulitan penerapan *ultra rapid freezing*, penggunaan larutan krioprotektan telah mampu mencegah terbentuknya kristal es selama prose pembekuan. Penambahan larutan krioprotektan dalam jumlah yang cukup dapat menjadikan komponen air dalam sel cenderung untuk membentuk struktur gelas (vitrifikasi) dari pada membentuk struktur kristal ketika didinginkan [9]. Krioprotektan agen dapat berfungsi untuk menurunkan *freezing point* dan menghambat formasi intracellular es [10].

Sampai saat ini, telah banyak krioprotektan agen yang digunakan dalam proses pembekuan. Kefektifan penggunaan krioprotektan salah satunya tergantung pada permeabilitas sel. Beberapa larutan krioprotektan mampu melakukan permeasi ke dalam sel dengan baik seperti glicerol, DMSO, metanol, dll, sehingga dapat menghambat formasi intraselular es. Akan tetapi, krioprotektan pada jumlah tertentu dapat merusak sel karena sifat toxic ataupun akibat perubahan volume selama proses permeasi [11]. Oleh karena itu, krioprotektan ini harus dibatasi penggunaannya. Selain krioprotektan tersebut di atas, terdapat juga krioprotektan yang tidak mampu melakukan permeasi ke dalam sel. Sukrose dan beberapa zat gula termasuk dalam krioprotektan ini. Tanpa hadirnya krioprotektan yang mampu permeasi, krioprotektan ini umumnya kurang dapat melindungi sel dari kerusakan pembekuan. Akan tetapi, krioprotektan jenis ini dapat membantu meningkatkan vitrifikasi larutan, menyetabilkan protein dan membran, serta mencegah perkembangan kristal es [12][13].

Oleh karena itu, dalam penelitian ini kami mencoba mengamati kemungkinan inhibisi kristal es dengan larutan krioprotektan kombinasi glicerol dan sukrosa.

MATERIAL DAN METODE PENELITIAN

Bahan uji yang digunakan adalah jaringan epidermis bawang bombai. Jaringan epidermis bawang merupakan jaringan *monolayer* dengan tebal sekitar ~90m dan memiliki ukuran sel yang relatif besar sekitar 50~80m. Kandungan air dalam sel lebih dari 70%, sehingga pengamatan formasi kristal es dalam sel dapat dilakukan dengan jelas menggunakan mikroskop cahaya. Campuran glicerol dan larutan sukrose digunakan sebagai krioprotektan. Kami menggunakan larutan sukrosa dengan konsentrasi 0.8 M, dan glicerol ditambahkan ke dalamnya dengan variasi kandungan 5%vol, 10%vol, dan 20%vol, 30%vol. Dalam penelitian ini, testing material dicelupkan ke dalam krioprotektan selama semalam dengan temperatur 4°C, sebelum kemudian dibekukan.

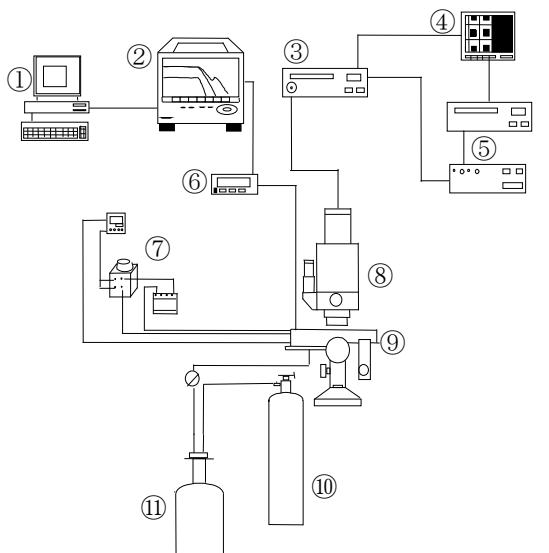


Gb.1 Skema *solidification stage*

Proses pembekuan dilakukan dengan menggunakan *solidification stage*. Skema dari *solidification stage* tampak pada Gb.1. Alat ini terbuat dari tembaga dengan diameter 38 mm. Sebuah heater listrik diletakkan dalam *solidification stage* dan dihubungkan dengan sebuah regulator guna mengontrol kecepatan pendinginan. Untuk

membekukan sel bawang kami menggunakan nitrogen cair yang dialirkan melalui saluran yang terdapat dalam *solidification stage*. Proses pendinginan kami lakukan dalam dua tahap. Pertama adalah pendinginan awal (*pre-cooling*) yang dilakukan dari suhu ruang (~27°C) sampai 4°C dengan kecepatan 4°C/min.

Tahapan ini kami lakukan agar keseragaman temperatur pada material dapat tercapai sebelum dilakukan pendinginan cepat. Tahap berikutnya material didinginkan dari 4°C hingga -80°C dengan kecepatan relative tinggi, yakni 40 °C/min dan 70°C/min. Kami tidak bisa mendapatkan kecepatan lebih dari 70°C/min karena keterbatasan kemampuan dari *solidification stage* yang kami miliki.



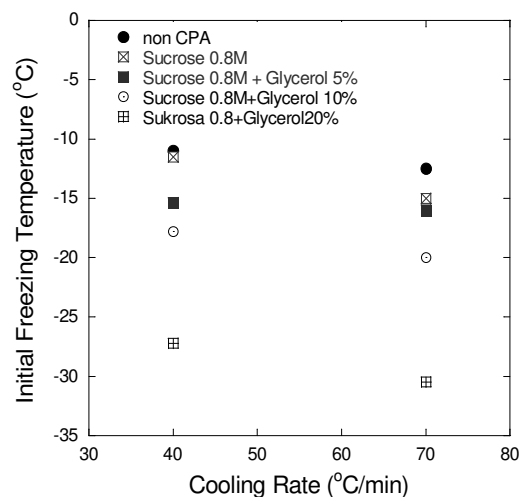
- (1). Personal Computer
- (2). Data Logger
- (3). DVD Recorder
- (4). Monitor
- (5). Video Timer
- (6). Fiber-optic Thermometer
- (7). Program Regulator
- (8). Digital Microscope
- (9). Solidification Stage
- (10). Tabung Gas Nitrogen
- (11). Tanki Nitrogen cair

Gb.2 Skema instalasi penelitian

Formasi kristal es yang terjadi didalam sel bawang kami amati dengan menggunakan mikroskop cahaya digital. Mikroskop kami hubungkan dengan sebuah monitor dan DVD recorder sehingga dapat dilakukan pengamatan yang lebih teliti. Untuk mengetahui temperatur bahan uji selama pendinginan, kami menggunakan sebuah fiber optic thermometer yang kami letakkan tepat dibawahnya. Gambar 2 menunjukkan skema lengkap dari instalasi penelitian kami.

HASIL DAN DISKUSI

Observasi mikroskopik telah kami lakukan pada proses pembekuan jaringan epidermis bawang bombai. Pengamatan dilakukan secara visualisasi dengan menggunakan mikroskop cahaya digital dan juga pengukuran suhu dengan *fiber optic thermometer*. Gambar 3 menunjukkan rata-rata *freezing initiation temperature*, yakni temperatur dimana pembekuan mulai terjadi pada sel. Dari hasil pengamatan menunjukkan pembekuan sel bawang tanpa CPA

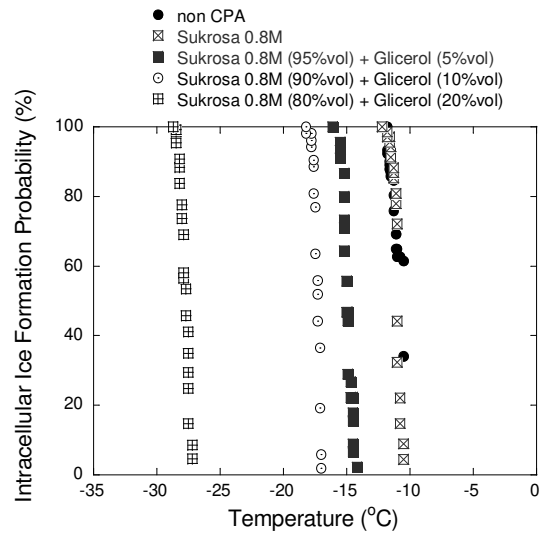


Gb.3 Rata-rata *freezing initiation temperature* sel bawang.

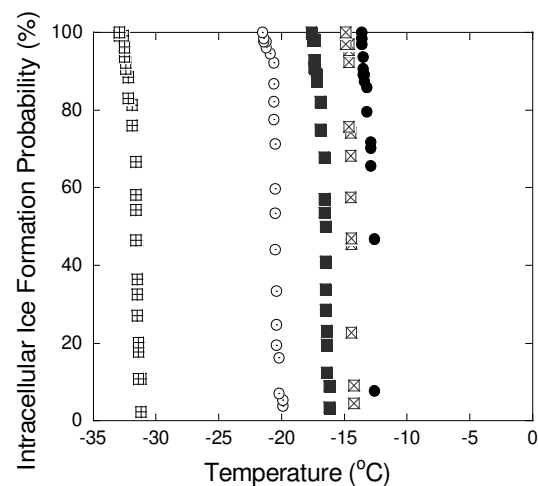
mulai terjadi pada suhu sekitar -11°C dengan laju pembekuan $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$, tetapi dengan penambahan CPA (sukrosa 0.8 M 80%vol + glicerol 20%vol) pembekuan baru mulai terjadi pada suhu sekitar $-27,2^{\circ}\text{C}$. Sedangkan pada laju pendinginan $70^{\circ}\text{C}/\text{min}$, kristal es mulai terbentuk pada suhu $-12,5^{\circ}\text{C}$ dan $-30,5^{\circ}\text{C}$ masing-masing untuk sample non CPA dan sample dengan larutan krioprotektan (sukrosa 0.8 M 80%vol + glicerol 20%vol). Hasil ini menunjukkan adanya penurunan *freezing initiation temperature* akibat peningkatan konsentrasi krioprotektan (CPA) dan peningkatan laju pendinginan. Penambahan larutan krioprotektan pada sample mengakibatkan adanya peningkatan konsentrasi konstituen dalam sel. Viskositas yang tinggi pada larutan konsentrasi tinggi dapat menghambat proses terbentuknya inti es (*nucleation*) [14], sehingga kristal es akan mulai terbentuk pada suhu yang lebih rendah. Sedangkan pada proses pendinginan dengan laju tinggi, penurunan temperatur menjadi lebih cepat dan nukleasi es akan terjadi pada suhu yang rendah pula.

Perbandingan temperatur pembekuan antara sel bawang yang menggunakan krioprotektan dan tanpa krioprotektan dibuat secara kuantitatif dalam Gb.4. Gambar 4(a) dan (b) menunjukkan pengaruh penambahan krioprotektan pada laju pendinginan $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ dan $70^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Seperti yang pada gambar tersebut, probabilitas formasi kristal es pada sampel dengan konsentrasi krioprotektan yang lebih tinggi terjadi pada suhu yang rendah.

Menurut Zaritsky [14], penurunan *freezing initiation temperature*/peningkatan *supercooling* dapat memicu terbentuknya inti es (*nucleus*) dalam jumlah besar, sehingga molekul air yang tersedia dalam sel akan terdistribusi pada inti yang lebih banyak akibatnya ukuran butiran es kristal menjadi lebih kecil. Tercapainya butiran kristal es yang kecil merupakan hal yang sangat penting dalam proses pembekuan material biologi. Dalam penelitian ini, kecenderungan menjadi kecilnya ukuran butiran kristal es akibat pemakaian krioprotektan dapat kita lihat dari hasil pengamatan secara visualisasi pada pembekuan sel bawang.



(a) cooling rate $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$.



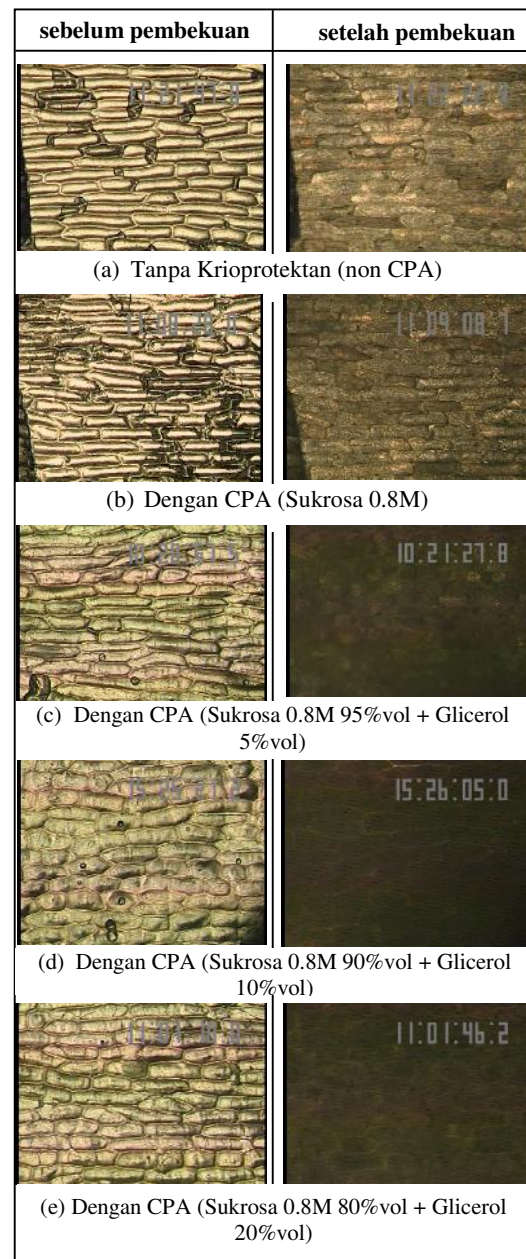
(b) cooling rate $70^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Gb.4 Probabilitas formasi intraselular kristal es dalam sel bawang.

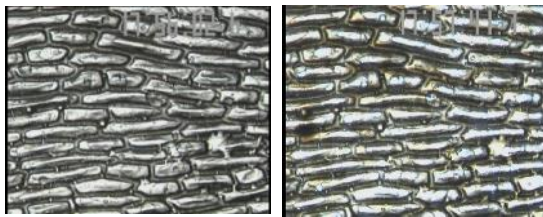
Gambar 5 menunjukkan tipikal sel bawang sebelum dan setelah dibekukan dengan kecepatan pendinginan $70^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Apabila kita amati dengan cermat, tampak adanya perubahan warna sebelum dan setelah proses pembekuan. Sel bawang yang beku memiliki warna yang gelap dibanding kondisi awal. *Scattering* cahaya

oleh kristal es yang terbentuk di dalam sel mengakibatkan sel-sel beku tersebut tampak gelap (hitam). Menurut Sakai [15], semakin kecil ukuran kristal es yang terbentuk, maka sel beku akan tampak lebih gelap (efek *flashing*). Dengan adanya fenomena *scattering* cahaya oleh kristal es, maka kita bisa mengidentifikasi pembentukan kristal es dengan mudah. Gambar 5 menunjukkan bahwa penggunaan krioprotektan kombinasi sukrosa dan glycerol mampu memperkecil ukuran butir kristal es. Hal ini ditandai dengan penampakan yang semakin gelap pada sampel yang menggunakan krioprotektan dibanding dengan sample yang dibekukan tanpa krioprotektan. Penambahan larutan krioprotektan selalu mengakibatkan peningkatan konsentrasi konstituen dan penurunan jumlah molekul-molekul H₂O bebas [15]. Sehingga dalam hal ini, pembentukan kristal es selain terkontrol oleh viskositas yang tinggi, juga terkontrol oleh suplai molekul H₂O yang persediaannya terbatas.

Dengan kombinasi penambahan larutan krioprotektan konsentrasi tinggi dan laju pendinginan cepat, maka akan mempermudah tercapainya vitrifikasi sample. Karena penambahan larutan krioprotektan dalam jumlah yang cukup dapat menjadikan komponen air dalam sel cenderung untuk membentuk struktur gelas (vitrifikasi) dari pada membentuk struktur kristal [9]. Dalam penelitian ini, kami dapat mencapai vitrifikasi sel bawang pada kondisi laju pendinginan 70°C/min dengan penggunaan krioprotektan (sukrosa 0.8 M 70%vol + glicerol 30%vol). Pada kondisi ini kristal es tetap tidak terbentuk meskipun temperatur pendinginan mencapai 80°C, hal ini bisa dilihat pada Gb.6. Pada gambar tersebut terlihat sel bawang masih terlihat bening seperti gelas meski telah mencapai suhu -80°C. Tidak nampak efek *scattering* cahaya akibat formasi kristal es. Hal ini menunjukkan vitrifikasi sel bawang dapat tercapai [5]. Meskipun vitrifikasi sel bawang dapat tercapai, perlu dicermati bahwa hal tersebut tidak bisa lepas dari penggunaan krioprotektan dengan konsentrasi tinggi yang tentunya kurang baik bagi viabilitas sel.



Gb.5 Formasi kristal es pada sel bawang pada *cooling rate* 70°C/min.



(a) sebelum pembekuan (b) sel beku (-80°C)

Gb.6 Vitrifikasi sel bawang dengan CPA
75%vol. sukrosa (0.8M) + 35%vol.
glicerol (*cooling rate* 70°C/min)

KESIMPULAN

Kesimpulan yang bisa ditarik dari hasil penelitian ini adalah:

- 1) Krioprotektan kombinasi sukrosa dan glicerol memiliki kemampuan untuk melakukan inhibisi kristal es dalam sel bawang.
- 2) Peningkatan konsentrasi krioprotektan glicerol-sukrosa dapat menurunkan temperatur pembekuan dan memperkecil butiran kristal es.
- 3) Vitrifikasi sel bawang dapat tercapai pada penggunaan krioprotektan konsentrasi tinggi (sukrosa 0.8 M 70%vol + glicerol 30%vol) dengan laju pendinginan 70°C/min, sedangkan pada konsentrasi krioprotektan yang lebih rendah dan laju pendinginan dibawah 70°C vitrifikasi masih sulit untuk tercapai.

DAFTAR PUSTAKA

[1]. Mazur P., 1984, Freezing of Living Cells: Mechanisms and Implications. *American Journal of Physiology*, 143:C125-C142.

[2]. Meryman H.T., 1963, Preservation of Living Cells, *Federation Proceedings* 22 (IPI):81.

[3]. Ishiguro H., Rubinsky B., (1994). Mechanical Interactions Between Ice Crystals and Red Blood Cells During Directional Solidification *Cryobiology* 31, 483-500.

[4] Takamatsu. H., Rubinsky. B., (1999). Viability of Deformed Cells, *Cryobiology*, Vol. 39, pp. 243-251.

[5] 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.

[6] Pegg DE, 2001, The current status of tissue preservation, *Cryo Letters* 22, 105-114.

[7] Kim, N.K. and Hung, Y.C., 1994, Freeze-cracking in foods as affected by physical properties. *J. Food Sci.* 59(3), 669-674.

[8] Kalichevsky, M.T., Knorr, D. and Lillford, P.J., 1995, Potential applications of high-pressure effects on ice-water transitions, *Trends Food Sci. Technol.* 6, 253-259.

[9] Song YC, Kirabadi BS, Lightfoot F, Brockbank KG and Taylor MJ, 200, Vitreous cryopreservation maintains function of vascular grafts, *Nature Biotechnology*, 18, 296-299.

[10] Farrant, J. 1980. General observations on cell preservation. In: M.J. Ashwood-Smith and J. Farrant, Eds. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, Pitman Medical Limited, Kent, England, p. 1-18.

[11] Mazur, P., and U. Schneider. 1986. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implication. *Cell Biophys.* 8(4):259-85

[12] Fahy GM, MacFarlane DR. Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.

[13] Fahy GM, 1986, The Relevance of Cryoprotectant "toxicity" to Cryobiology, 23 : 1-13

[14] Zaritsky N., 2006, Physical-Chemical Principles in Freezing, in *Handbook of Frozen Food Processing and*

- Packaging, Taylor & Francis Group,4–29.
- [15] Uchida T, Nagayama M., Shibayama T., and Gohara K. (2007). Morphological investigations of disaccharide molecules for growth inhibition of ice crystal, J. of Crystal Growth, pp. 125-135.