

Pemanfaatan Teknik Kriopreservasi dalam Penyimpanan Plasma Nutfah Tanaman

Ika Roostika Tambunan dan Ika Mariska

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor

ABSTRACT

The two basic approaches for conservation of plant genetic resources are *ex situ* and *in situ* conservation. Cryopreservation is a potential method for long term preservation of plant germplasm. Cryopreservation technique could be used to preserve plant materials with unlimited time (until 20 years) because it bring the materials to metabolically inactive state and completely arrest the growth in liquid nitrogen at -196°C . This method is more efficient in terms of cost, time, space, and labour because it does not require frequently subculture. Cryopreservation techniques can be divided in to classical technique and new techniques. Classical technique can be applied to limited species but new techniques can be applied to wide range of species and many types of explant. The success of cryopreservation is not only indicated by the high rate of survival and regenerated culture, but also on the stability level of culture after cryopreservation.

Key words: Conservation, *in vitro*, cryopreservation.

ABSTRAK

Penyimpanan plasma nutfah dapat dilakukan secara *ex situ* dan *in situ*. Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan jangka panjang. Dalam hal ini, bahan tanaman disimpan di dalam nitrogen cair yang mempunyai suhu -196°C . Pada suhu tersebut, bahan tanaman hampir sama sekali tidak mengalami proses metabolisme sehingga masa penyimpanan menjadi tidak terbatas (hingga 20 tahun). Penyimpanan dengan cara tersebut tidak memerlukan tindakan subkultur yang berulang-ulang sehingga lebih efisien dari segi biaya, waktu, ruang penyimpanan, dan tenaga. Teknik kriopreservasi dibedakan atas teknik lama dan teknik baru. Teknik lama hanya dapat diterapkan pada spesies tertentu, sedangkan teknik baru dapat diterapkan pada skala spesies yang lebih luas dan jenis eksplan yang lebih banyak. Keberhasilan teknik kriopreservasi tidak hanya ditunjukkan oleh kemampuan hidup dan regenerasi bahan tanaman pasca kriopreservasi tetapi juga ditentukan oleh tingkat stabilitas genetiknya.

Kata kunci: Penyimpanan, *in vitro*, kriopreservasi.

PENDAHULUAN

Plasma nutfah tanaman merupakan modal dasar dalam perakitan varietas unggul. Oleh karena itu, plasma nutfah perlu disimpan dan dilestarikan.

Pelestarian plasma nutfah dapat dilakukan secara *in situ* (di dalam habitat) dan *ex situ* (di luar habitat) yang dapat berupa kebun raya, kebun koleksi, ruang atau penyimpanan benih, dan pelestarian secara *in vitro* (Wattimena *et al.* 1992).

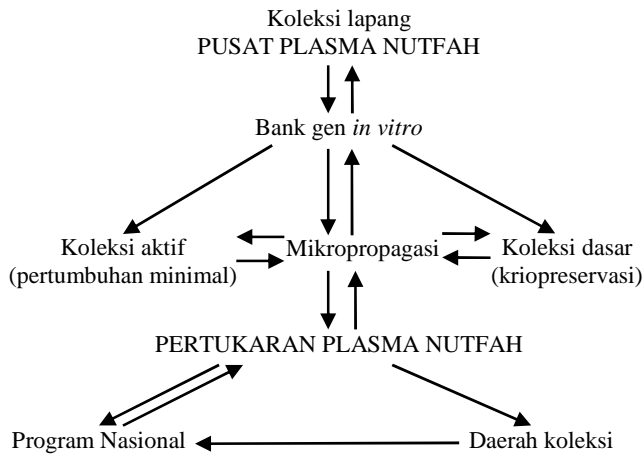
Teknik pelestarian/penyimpanan secara *in vitro* meliputi (1) penyimpanan jangka pendek (penyimpanan dalam keadaan tumbuh), (2) penyimpanan jangka menengah (penyimpanan dengan metode pertumbuhan lambat atau pertumbuhan minimal), dan (3) penyimpanan jangka panjang dengan metode kriopreservasi (Mariska *et al.* 1996). Penyimpanan secara *in vitro* terutama diterapkan pada tanaman yang mempunyai benih rekalsitran dan yang berkembang biak secara vegetatif.

Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan pada suhu yang sangat rendah (-196°C) dalam nitrogen cair. Teknik ini potensial dikembangkan untuk penyimpanan plasma nutfah tumbuhan dalam jangka panjang (Bajaj 1979; Withers 1980; Towill dan Jarret 1992).

Dengan teknik kriopreservasi, pembelahan sel dan proses metabolisme dalam sel, jaringan, atau organ bahan tanaman yang disimpan dapat dihentikan sehingga tidak terjadi modifikasi atau perubahan dalam waktu yang tidak terbatas (Bhojwani dan Razdan 1983; Ashmore 1997). Menurut Grout (1995), kondisi suhu penyimpanan bahan tanaman dengan teknik kriopreservasi sangat rendah, yaitu -160 hingga -180°C (nitrogen fase uap) bahkan sampai -196°C (nitrogen fase cair).

Plasma nutfah yang disimpan dengan teknik kriopreservasi berstatus sebagai *base collection* (koleksi dasar) dalam bank gen *in vitro*, sedangkan

yang disimpan dengan teknik pertumbuhan minimal berstatus sebagai *active collection* (koleksi aktif) (Gambar 1). Koleksi tanaman di lapang merupakan *working collection* (koleksi kerja).



Sumber: Kartha (1985).

Gambar 1. Pemanfaatan kultur *in vitro* dan kriopreservasi serta pertukaran plasma nutfah.

KELEBIHAN DAN KEKURANGAN

Setiap teknik penyimpanan mempunyai kelebihan dan kekurangan. Pada penyimpanan *in vitro* jangka pendek dan jangka menengah diperlukan tindakan subkultur yang berulang-ulang sehingga kurang efisien dalam hal waktu, tenaga, ruangan, dan biaya. Tindakan tersebut juga dapat menyebabkan kultur mengalami kontaminasi dan kehilangan vigoritas karena kehabisan unsur hara yang terdapat dalam media dan berpeluang terjadinya perubahan genetik akibat penggunaan zat penghambat tumbuh dalam jangka waktu yang relatif lama (Kartha 1985).

Dengan teknik kriopreservasi, kekurangan dari metode penyimpanan *in vitro* tersebut dapat ditekan seminimal mungkin karena bahan tanaman disimpan dalam ruangan bersuhu sangat rendah. Pada suhu yang sangat rendah, sel-sel tanaman tidak mempunyai aktivitas metabolik dengan viabilitas yang tetap terpelihara sehingga bahan tanaman dapat disimpan dalam jangka waktu yang sangat lama (hingga 20 tahun) tanpa memerlukan tindakan subkultur yang berulang-ulang (Kartha 1985).

Penyimpanan plasma nutfah dengan teknik kriopreservasi tidak membutuhkan ruangan yang besar karena tabung nitrogen cair cukup memadai untuk menyimpan bahan tanaman dalam ragam dan jumlah yang banyak. Selain itu, teknik kriopreservasi tidak menyebabkan perubahan tanaman yang disimpan karena tidak menggunakan zat penghambat tumbuh. Menurut Sakai (1993), kriopreservasi yang dilakukan terhadap sel dan meristem menjadi metode penting dalam penyimpanan plasma nutfah untuk jangka panjang karena hanya diperlukan ruang yang minimum dan tidak terjadinya perubahan genetik. Dalam implementasinya, teknik kriopreservasi memerlukan keterampilan khusus dan nitrogen cair perlu tersedia secara kontinu.

PERKEMBANGAN PENELITIAN KRIOPRESERVASI DI INDONESIA

Teknik kriopreservasi mulai diperkenalkan pada tahun 80-an dan dewasa ini sudah berkembang, baik dalam penelitian maupun bank gen. Penelitian kriopreservasi telah diterapkan pada tanaman subtropis dan tropis, baik berupa tanaman herbaceous maupun berkayu.

Di Indonesia, penelitian kriopreservasi baru dimulai pada tahun 1992 (Sudarmonowati 2000). Tanaman yang telah berhasil disimpan secara kriopreservasi adalah tanaman hutan dan buah-buahan seperti *Acacia mangium*, *Paraserianthes falcataria*, *Pometia pinnata*, *Litchi sinensis*, *Euporia longan*, dan *Citrus sinensis* dengan tingkat keberhasilan hidup rendah hingga sedang (15-80%). Teknik kriopreservasi juga telah berhasil diterapkan pada tanaman hortikultura dan tanaman pangan seperti *Allium sativum*, *Glycine max*, dan *Zea mays* dengan tingkat keberhasilan hidup cukup tinggi (77-90%).

Di Balitbiogen, penelitian kriopreservasi telah diterapkan pada tanaman obat langka *Rauvolfia serpentina* dengan tingkat keberhasilan hidup 40% (Prasetyorini 1999) dan pada tanaman ubi jalar dengan tingkat hidup jaringan hingga 77% tetapi kultur tidak mampu tumbuh atau beregenerasi dan akhirnya mati (Roostika 2003). Saat ini sedang dilakukan penelitian kriopreservasi tanaman ubi kayu (*Manihot utilissima*). Hasil sementara menunjukkan tingkat keberhasilan hidup kultur dan beregenerasi mencapai 50%.

RAGAM TEKNIK KRIOPRESERVASI

Teknik kriopreservasi dapat dibedakan atas teknik lama (klasik) dan teknik baru. Teknik lama didasarkan pada *freeze-induced dehydration*, yaitu dehidrasi yang diinduksi dengan pembekuan pada suhu di bawah titik beku air hingga -40°C , sedangkan teknik baru didasarkan pada *vitrification*, yaitu dehidrasi yang diinduksi pada suhu di atas titik beku air (Kartha 1985; Ashmore 1997). Teknik lama juga disebut teknik pembekuan lambat atau teknik pembekuan dua tahap. Teknik pembekuan dua tahap meliputi inkubasi sel pada krioprotektan dengan total konsentrasi 1-2 M yang menyebabkan dehidrasi moderat dan diikuti oleh pembekuan lambat, misalnya dengan kecepatan $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ hingga suhu -35°C , lalu pembekuan dalam nitrogen cair dan selanjutnya *thawing* (pelelehan).

Vitrification (vitrikifikasi) adalah fase transisi air dari bentuk cair menjadi bentuk nonkristalin atau amorf, tembus pandang (*glassy*) karena elevasi ekstrim dari larutan yang viskos selama pendinginan (Grout 1995). Teknik vitrikifikasi didasarkan pada dehidrasi sel pada suhu *non-freezing* (tidak beku), yaitu dengan merendam bahan dalam larutan krioprotektan dengan total konsentrasi 5-8 M pada suhu $0-25^{\circ}\text{C}$ dan diikuti oleh pembekuan dan selanjutnya pelelehan. Macam teknik baru yang telah berkembang adalah (1) vitrikifikasi, (2) enkapsulasi-dehidrasi, (3) enkapsulasi-vitrikifikasi, (4) desikasi, (5) pratumbuh, (6) pratumbuh-desikasi, dan (7) *droplet-freezing* (Ashmore 1997; Engelmann 2000).

Pada teknik vitrikifikasi, bahan tanaman diperlakukan dengan senyawa krioprotektif dan dehidrasi dengan larutan vitrikifikasi, lalu diikuti dengan pembekuan cepat, pelelehan, dan pembuangan krioprotektan serta pemulihan kultur. Teknik enkapsulasi-dehidrasi didasarkan pada teknologi yang telah dikembangkan pada produksi benih sintetik. Pada teknik tersebut, bahan tanaman dienkapsulasi pada kapsul alginat, lalu ditumbuhkan pada medium yang diperkaya dengan sukrosa dan dikeringkan secara parsial dalam *laminar air flow cabinet* atau gel silika hingga kandungan air sekitar 20% dan diikuti oleh pembekuan cepat.

Teknik enkapsulasi-vitrikifikasi merupakan kombinasi antara teknik vitrikifikasi dan enkapsulasi-dehidrasi, yaitu bahan tanaman dienkapsulasi dengan kapsul alginat, lalu dibekukan dengan teknik vitrikifikasi. Teknik desikasi merupakan teknik yang paling sederhana, yaitu mengeringkan bahan tanaman dalam *laminar air flow cabinet*, gel silika atau *flash drying* hingga kandungan air 10-20%, kemudian diikuti oleh pembekuan cepat.

Teknik pratumbuh meliputi penanaman bahan tanaman ke dalam media yang mengandung krioprotektan, lalu diikuti oleh pembekuan cepat. Teknik pratumbuh-desikasi dilakukan dengan menanam bahan tanaman ke dalam media yang mengandung krioprotektan, lalu mengeringkannya dalam *laminar air flow cabinet* atau gel silika dan diikuti oleh pembekuan cepat. *Droplet-freezing* diawali dengan praperlakuan bahan tanaman ke dalam media cair yang mengandung krioprotektan, lalu meletakkan pada Al-foil yang disertai dengan droplet krioprotektan dan diikuti oleh pembekuan cepat.

Teknik kriopreservasi telah banyak diterapkan pada berbagai tanaman. Beberapa tanaman yang telah berhasil disimpan secara kriopreservasi disajikan pada Tabel 1.

Teknik lama memerlukan peralatan terprogram yang cukup mahal harganya, sedangkan teknik baru tidak memerlukan peralatan canggih dan prosedurnya relatif lebih mudah. Menurut Ashmore (1997) dan Engelmann (2000), teknik lama memerlukan peralatan pembekuan, digunakan pada kultur sel, dan lebih sulit diaplikasikan pada unit sel yang lebih besar seperti tunas apikal atau embrio. Takagi (2000) mengungkapkan pula bahwa teknik lama berhasil diterapkan pada sistem kultur yang tidak terdiferensiasi (suspensi sel dan kalus) dan spesies yang toleran terhadap suhu dingin, namun tidak berhasil diterapkan pada spesies tropis. Teknik vitrikifikasi telah berhasil diterapkan pada spesies dengan skala yang lebih luas (tropis dan subtropis) dan sistem kultur yang lebih kompleks (embriosomatik, suspensi sel, dan meristem apikal).

Tabel 1. Tanaman yang berhasil disimpan secara kriopreservasi.

Tanaman	Teknik kriopreservasi	Eksplan	Referensi
<i>Manihot esculenta</i>	Pembekuan lambat	Tunas apikal	Escobar <i>et al.</i> 1997
<i>Pyrus</i> spp.	Pembekuan lambat	Meristem apikal	Reed 1990
<i>Glycine max</i>	Pembekuan lambat	Suspensi sel	Luo dan Widholm 1997
<i>Coffea arabica</i>	Pembekuan lambat dan pembekuan cepat	Biji	Dussert <i>et al.</i> 2000
<i>Saccharum</i> spp.	Enkapsulasi-dehidrasi	Tunas apikal	Paulet <i>et al.</i> 1993
<i>Actinidia</i> spp.	Enkapsulasi-dehidrasi	Tunas apikal	Bachiri <i>et al.</i> 2001
<i>Solanum tuberosum</i>	Enkapsulasi-vitrifikasi	Meristem apikal	Hirai dan Sakai 1999b
Strawberry (<i>Fragaria X ananassa</i>)	Enkapsulasi-vitrifikasi	Meristem apikal	Hirai <i>et al.</i> 1998
<i>Ipomea batatas</i>	Vitrifikasi	Tunas apikal	Towill dan Jarret 1992
<i>Citrus sinensis</i>	Vitrifikasi	Sel nuklear	Sakai <i>et al.</i> , 1990
<i>Malus domestica</i>	Vitrifikasi	Tunas apikal	Niino <i>et al.</i> 1992
<i>Mentha</i> sp.	Vitrifikasi	Tunas apikal	Towill 1990
<i>Mentha spicata</i>	Vitrifikasi	Tunas aksilar	Hirai dan Sakai 1999a
<i>Asparagus officinalis</i>	Vitrifikasi	Suspensi sel	Nishizawa <i>et al.</i> 1993
<i>Trifolium repens</i>	Vitrifikasi	Kalus meristematik	Yamada <i>et al.</i> 1991
<i>Bletilla striata</i>	Vitrifikasi	Embriozigotik	Ishikawa <i>et al.</i> 1997
<i>Asparagus officinalis</i>	Pratumbuh-desikasi	Tunas aksilar	Uragami <i>et al.</i> 1990
<i>Elaeis guineensis</i>	Pratumbuh-desikasi	Embriosomatik	Dumet <i>et al.</i> 1993

EKSPLAN YANG DAPAT DISIMPAN SECARA KRIOPRESERVASI

Teknik kriopreservasi yang baru dapat diterapkan pada penyimpanan berbagai jenis eksplan seperti suspensi sel, kalus embriogenik, meristem, tunas apikal, tunas aksilar, biji, dan polen. Penyimpanan eksplan dalam teknik suspensi sel, kalus embriogenik, biji, dan polen dimaksudkan untuk mempertahankan dan melestarikan keragaman genetik. Menurut Panis *et al.* (2000), suspensi sel embriogenik sering digunakan terutama untuk tanaman monokotil sebagai bahan untuk transformasi dan khususnya bagi tanaman steril yang tidak dapat menghasilkan embriozigotik (biji). Biji dan polen biasanya disimpan dengan teknik desikasi karena kandungan air dalam kedua bahan tersebut relatif lebih sedikit.

Towill dan Walters (2000) menyatakan bahwa polen disimpan dengan tujuan untuk penyediaan bahan bagi program pemuliaan, distribusi dan pertukaran plasma nutfah, penyimpanan gen inti dalam plasma nutfah, penelitian fisiologi dasar, biokimia dan fertilitas serta penelitian ekspresi gen, transformasi dan pembuahan *in vitro*. Menurut Inagaki (2000) penyimpanan polen juga dilakukan untuk tujuan memproduksi tanaman dobel haploid.

Penyimpanan biji secara kriopreservasi juga penting dilakukan bagi tanaman yang berbenih rekalsitran (Berjak *et al.* 2000; Normah *et al.* 2000). Struktur meristem, tunas apikal, dan tunas aksilar merupakan struktur yang terdiferensiasi sehingga cenderung mempunyai sifat yang sama dengan induknya. Penyimpanan eksplan tersebut dimaksudkan untuk memelihara stabilitas genetik bahan tanaman. Sebagaimana yang dikemukakan Takagi (2000), penyimpanan secara *in vitro* menggunakan tunas apikal (meristem) lebih disarankan karena stabilitas genetik lebih terjamin.

FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KEBERHASILAN KRIOPRESERVASI

Sejumlah faktor yang mempengaruhi keberhasilan kriopreservasi dengan teknik pembekuan lambat adalah (1) kecepatan pembekuan, (2) jenis dan konsentrasi krioprotektan, (3) suhu akhir pembekuan, dan (4) tipe dan keadaan fisiologis bahan yang akan disimpan (Kartha 1985). Jika pembekuan terlalu lambat maka sel terlalu terdehidrasi sehingga konsentrasi zat elektrolit dalam sel menjadi tinggi. Jika pembekuan terlalu cepat maka sel kurang mengalami dehidrasi sehingga terjadi formasi es intraseluler yang bersifat letal. Penambahan krio-

protektan dapat memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi. Krioprotektan yang umum digunakan adalah DMSO, gliserol, PEG, sorbitol, dan manitol. Menurut Kartha (1985), senyawa dalam krioprotektan dapat dipisah menjadi dua, yaitu senyawa yang dapat masuk ke dalam 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-vitrifikasi, dan *droplet freezing*, keberhasilan ditentukan oleh jenis, konsentrasi, dan lama perendaman dalam krioprotektan. Untuk teknik desikasi, enkapsulasi-desikasi, dan pratumbuh-desikasi, keberhasilan ditentukan oleh kandungan air bahan tanaman sebelum perendaman dalam nitrogen cair. 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 mentolerir formasi es ekstraseluler. Namun demikian, formasi es ekstraseluler juga dapat merusak sel karena daya mekanis dari kristal es yang tumbuh, gaya adesi kristal es terhadap membran, interaksi listrik yang disebabkan oleh perbedaan solubilitas ion pada fase es dan cair, formasi gelembung udara intraseluler, luka khemis yang berhubungan dengan peroksidase lipid dan perubahan pH pada lokasi tertentu (Grout 1995).

Sel yang terdehidrasi terlalu kuat dapat mengalami plasmolisis yang kuat pula 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) (Dumet and Benson 2000). Radikal bebas dapat merusak fraksi lipid pada membran dan menghasilkan lipid peroksida dan selanjutnya terurai menjadi senyawa produk oksidasi sekunder yang toksik (Benson *et al.* 1992; Dumet dan Benson 2000).

CARA UNTUK MENINGKATKAN KEBERHASILAN KRIOPRESERVASI

Secara natural, tanaman mempunyai mekanisme toleransi terhadap pembekuan, antara lain (1) mencegah denaturasi protein yang diinduksi oleh pembekuan, (2) mencegah presipitasi molekul, (3) mencegah terbentuknya formasi es intraseluler, (4) stabilisasi membran dengan polipeptida hidrofilik, (5) desaturasi asam lemak, (6) ekspresi gen yang spesifik terhadap toleransi suhu dingin seperti protein *Late-embryogenesis abundant proteins* (LEA), *Cold-regulated proteins* (COR), dan *Anti-freeze proteins* (AFPs), serta (7) akumulasi sukrosa dan gula sederhana lainnya (Dumet dan Benson 2000). Menurut Fujikawa dan Jitsuyama (2000), di antara beberapa macam mekanisme proteksi, akumulasi karbohidrat terlarut merupakan faktor yang paling kuat untuk menghindarkan sel dari kerusakan pada saat pembekuan.

Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam meningkatkan keberhasilan teknik kriopreservasi adalah (1) kondisi awal bahan, (2) tindakan praperlakuan, (3) prosedur kriopreservasi, dan (4) tindakan pasca pelelehan (Reinoud *et al.* 2000). Penggunaan bahan tanaman yang masih muda atau juvenil lebih baik daripada bahan yang sudah tua. Sel tanaman yang tumbuh secara eksponensial lebih toleran terhadap pembekuan daripada sel pada fase log atau stasioner (Yoshida *et al.* 1993). Sel dengan volume terkecil yang memiliki vakuola berukuran

kecil dengan kandungan air yang relatif sedikit juga menentukan keberhasilan kriopreservasi. Menurut Gnanapragasan dan Vasil (1992), prakultur sel pada manitol atau sorbitol dapat menyebabkan penurunan volume vakuola, yaitu dengan cara redistribusi 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), 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) (Withers 1985; 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 adalah yang dapat melindungi jaringan selama pembekuan tanpa bersifat toksik terhadap jaringan itu sendiri. Menurut Sakai (1993), 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 agar jaringan tidak mengalami rekristalisasi es karena kondisi yang kurang optimal. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa pelelehan cepat lebih baik daripada pelelehan lambat karena kenaikan suhu yang cepat tidak memberi kesempatan bagi cairan di dalam sel untuk 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 dapat mempertahankan daya hidup kultur juga mampu meregenerasikan kultur tanpa pembentukan formasi kalus intermedier. Formasi kalus intermedier tidak diharapkan karena dapat menimbulkan keragaman somaklonal.

CARA PENGUJIAN STABILITAS GENETIK KULTUR SETELAH PENYIMPANAN SECARA KRIOPRESERVASI

Keberhasilan kriopreservasi tidak hanya ditunjukkan oleh kemampuan kultur untuk dapat tumbuh kembali, tetapi juga harus tetap menampilkan karakteristik yang sama seperti kecepatan tumbuh, kemampuan regenerasi, tingkat ploidi, dan markah RAPD (Reinoud *et al.* 2000).

Penilaian stabilitas genetik kultur pasca kriopreservasi dapat dibedakan atas dua macam, yaitu:

1. Secara umum, meliputi pengaruh pembekuan terhadap sintesis produk metabolit sekunder, stabilitas DNA, stabilitas kromosom, sifat-sifat morfologi, dan daya regenerasi. Selain itu, penampakan lapang seperti fenotipe dan profil isosim juga perlu dilakukan.
2. Secara khusus, meliputi metode biokhemis dan molekuler yang merupakan pendekatan untuk mengevaluasi kerusakan, pemulihan, dan stabilitas jaringan yang dikriopreservasi.

Menurut Grout (1995), pengujian yang dapat dilakukan untuk meyakinkan stabilitas genetik adalah penampakan morfologi, kecepatan tumbuh dan hasil, sintesis produk sekunder, elektroforesis

protein, aktivitas enzim, flowcytometri, RFLP, pewarnaan kromosom, dan analisis gen rRNA.

Terdapat beberapa penelitian yang melaporkan stabilitas genetik bahan tanaman pasca kriopreservasi. Menurut Sakai *et al.* (1991) dalam Sakai (1995), sel nuselus yang telah disimpan secara kriopreservasi selama 1 tahun mempunyai potensi embriogenik yang identik dan tanaman yang diregenerasikannya mempunyai morfologi yang sama dengan tanaman kontrol. Niino (1997), mengungkapkan bahwa kriopreservasi tunas *mulberry* (selama 8 tahun) serta tunas pucuk apel dan pir (selama 3 tahun) menghasilkan planlet yang tidak menyimpang secara morfologi dan tidak menunjukkan perbedaan jumlah kromosom, pola zymogram untuk isosim peroksidase, dan pola pita protein daun. Hal serupa dilaporkan oleh Urbanova *et al.* (2002) yang mengatakan bahwa jumlah kromosom dan aktivitas mitotik meristem *Hypericum perforatum* yang disimpan secara kriopreservasi tidak berbeda nyata dengan kontrol. Hirai (2001), juga melaporkan tidak terdapat perbedaan yang nyata antara tanaman yang disimpan secara kriopreservasi dengan tanaman kontrol, terutama tinggi tanaman (kentang, stroberi, dan ubi kelapa), berat umbi (kentang), berat buah (stroberi), dan koefisien variasinya. Hasil pengujian lebih lanjut dengan analisis RAPD menggunakan 200 primer juga menunjukkan tidak adanya perbedaan antara tanaman yang disimpan secara kriopreservasi dengan tanaman kontrol.

KESIMPULAN

Teknik kriopreservasi merupakan teknik yang potensial untuk penyimpanan jangka panjang, yaitu menyimpan tanaman ke dalam nitrogen cair yang bersuhu -196°C . Penyimpanan dengan cara tersebut tidak memerlukan tindakan subkultur yang berulang-ulang sehingga lebih efisien dari segi biaya, waktu, ruang penyimpanan, dan tenaga. Keberhasilan teknik kriopreservasi tidak hanya ditunjukkan dengan kemampuan hidup regenerasi bahan tanaman pascakriopreservasi, namun juga ditentukan oleh tingkat stabilitas genetiknya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashmore, S.E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute. Rome. Italy. 67 p.
- Bachiri, Y., G.Q. Song, P. Plessis, A. Shoar-Ghaffari, T. Rekab, and C. Morisset. 2001. Routine cryopreservation of kiwifruit (*Actinidia* spp.) germplasm by encapsulation-dehydration: Importance of plant growth regulators. *Cryo. Letters* 22:61-74.
- Bajaj, Y.P.S. 1979. Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica* 28:267-285.
- Benson, E.E., P.T. Lynch, and J. Jones. 1992. Detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: Consequences for post-thaw survival. *Plant Science* 110:249-258.
- Berjak, P., M. Walker, D.J. Mycock, J. Wesley-Smith, P. Watt, and N.W. Pammenter. 2000. Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p. 140-155.
- Bhojwani S.S. and M.K. Razdan. 1983. *Plant tissue culture. Theory and Practise*. Elsevier. Amsterdam. New York. 502 p.
- Dumet, D., F. Engelmann, N. Chabrilange, and Y. Duval. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis*) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Report* 12:352-355.
- Dumet, D. and E.E. Benson. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p.43-56.
- Dussert, S., N. Chabrilange, F. Engelmann, F. Anthony, and S. Hamon. 2000. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: Toward a simplified protocol for routine use in coffee genebanks. In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p. 161-166.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p.8-20.

- Escobar, R.H., G. Mafla, and W.M. Roca. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Report* 16:474-478.
- Fujikawa, S. and Y. Jitsuyama. 2000. Ultrastructural aspects of freezing adaptation of cells by vitrification. *In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application.* IPGRI. Rome-Italy. p.36-42.
- Gnanapragasam, S. and I.K. Vasil. 1992. Cryopreservation of immature embryos, embryonic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science* 83:205-215.
- Goldner, E.M., U. Seitz, and E. Reinhard 1991. Cryopreservation of *Digitalis lanata* Erh cell cultures: Preculture and freeze tolerance. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 24:19-24.
- 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.
- Hirai, D. 2001. Studies on cryopreservation of vegetatively propagated crops by encapsulation-vitrification method. Report of Hokkaido Prefectural Agricultural Experiment Stations. No.99. The Hokkaido Central Agricultural Experiment Station. Japan.
- Hirai, D., K. Shirai, S. Shirai, and A. Sakai. 1998. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristem of strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch) by encapsulation-vitrification. *Euphytica* 101:109-115.
- Hirai, D. and A. Sakai. 1999a. Cryopreservation of *in vitro*-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. *Plant Cell Report* 19:150-155.
- Hirai, D. and A. Sakai. 1999b. Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of potato (*Solanum tuberosum* L.) by encapsulation-vitrification. *Potato Research* 42:153-160.
- Inagaki, M. 2000. Use of stored pollen for wide crosses in wheat haploid production. *In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application.* IPGRI. Rome-Italy. p. 130-135.
- Ishikawa, K., K. Harata, M. Mii, and A. Sakai. 1997. Cryopreservation of zygotic embryos of a Japanese terrestrial orchid (*Bletilla striata*) by vitrification. *Plant Cell Report* 16:754-757.
- Kartha, K.K. 1985. Meristem Culture and Gerplasm Preservation. *In Kartha, K.K. (Ed.). Cryopreservation of Plant Cell and Organs.* Cue Press. Florida. p. 116-134.
- Luo, X. and J.M. Widholm. 1997. Cryopreservation of the SB-M Photosynthetic soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) suspension culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant* 33:297-300.
- Mariska, I., Suwarno, dan D.S. Damardjati. 1996. Pengembangan konservasi *in vitro* sebagai salah satu bentuk pelestarian plasma nutfah di dalam bank gen. Seminar Penyusunan Konsep Pelestarian *Ex Situ* Plasma Nutfah Pertanian. Bogor, 18 Desember 1996. Balitbio. Bogor
- Niino, T., A. Sakai, and K. Nojiri. 1992. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28:261-266.
- Niino, T. 1997. Cryopreservation of deciduous fruits and mulberry trees. *In Razdan, M.K. and E.C. Cocking (Eds.). Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro.* Science Publishers Inc. USA. p. 196-223.
- Nishizawa, S., A. Sakai, Y. Amano, and T. Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91:67-73.
- Normah, M.N., G. Mainah, and R. Saraswathy. 2000. Cryopreservation of zygotic embryos of tropical fruit trees: A study on *Lansium domesticum* and *Braccaurea* species. *In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application.* IPGRI. Rome-Italy. p. 156-166.
- Panis, B., H. Schoofs, S. Remy, L. Sagi, and R. Swennen. 2000. Cryopreservation of banana embryogenic cell suspensions: An aid for genetic transformation. *In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application.* IPGRI. Rome-Italy. p. 103-109.
- Paulet, F., F. Engelmann, and J.C. Glazmann. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* planlets of sugarcane (*Saccharum* sp.) hybrids using encapsulation-dehydration. *Plant Cell Report* 12:525-529.
- Prasetyorini. 1999. Preservasi *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz. melalui teknik kultur *in vitro*. Thesis doctoral. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- Reed, B.M. 1990. Survival of *in vitro* grown apical meristem of *Pyrus* following cryopreservation. *HortSci* 25:111-113.
- Reinoud, 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.

- Roostika, I. 2003. Studi penyimpanan kultur *in vitro* ubi jalar (*Ipomea batatas* (L.) Lam) secara kriopreservasi. Thesis Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. 46 hal.
- Sakai, A., S. Kobayashi, and I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var *Brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Report* 9:30-33.
- Sakai, A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plant culture cells and meristem cooled to -196°C. *In* Cryopreservation of Plant Genetic Resources. Japan International Cooperation Agency. Japan. p. 5-26.
- Sakai, A. 1995. Cryopreservation of germplasm of woody plants. *In* Bajaj, Y.P.S. (Ed.). *Cryopreservation of Plant Germplasm I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 54-69.
- Sudarmonowati, E. 2000. Cryopreservation of tropical plants: Current research status in Indonesia. *In* Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy.
- Takagi, H. 2000. Recent development in cryopreservation of shoot apices of tropical species. *In* Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p. 178-193.
- Towill, L.E. 1990. Cryopreservation of isolated mint shoot tips by vitrification. *Plant Cell Report* 9:178-180.
- Towill, L.E. and R.L. Jarret. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Report* 11:175-178.
- Towill, L.E. and C. Walters. 2000. Cryopreservation of pollen. *In* Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. IPGRI. Rome-Italy. p. 115-129.
- Uragami, A., A. Sakai, and M. Magai. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from planlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Report* 9:328-331.
- Urbanova, M., E. Cellarova, and K. Kimakova. 2002. Chromosome number stability and mitotic activity of cryopreserved *Hypericum perforatum* L. meristems. *Plant Cell Report* 20:1082-1086.
- Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N.A. Matjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, dan A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi tanaman*. PAU IPB. Bogor. 306 hal.
- Withers, L.A. 1980. Preservation of germplasm in perspectives in plant cell and tissue culture. *In* Vasil, I.K. (Ed.). *Int. Cytol. Suppl.* 11B. p. 101-136.
- Withers, L.A. 1985. Cryopreservation and storage of germplasm. *In* Dixon, D.A. (Ed.). *Plant Cell Culture*. IRL Press. Washington. p. 169-190.
- Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura, and S. Higuchi. 1991. Cryopreservation of apical of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Science* 78:81-87.
- Yoshida, S., Y. Hattanda, and T. Suyama. 1993. Variations in chilling sensitivity of suspension cultures cell of mung bean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) during the growth cycle. *Plant Cell Physiology* 34:673-679.