

# Kriopreservasi untuk Konservasi Plasma Nutfah Tanaman: Peluang Pemanfaatannya di Indonesia

Semuel Leunufna

Fakultas Pertanian Universitas Pattimura, Ambon. Jl. Ir. M. Putuhena, Poka, Ambon 97231

## ABSTRACT

**Cryopreservation Technique for Conservation of Plant Germplasm: Its Possible Use in Indonesia. Semuel Leunufna.** Increasing rate of plant germplasm lost in Indonesia has promoted the implementation of various methods for their conservation. Cryopreservation is a technique applicable for a long-term preservation (base collection) of plants possessing non-orthodox (recalcitrant and semi-recalcitrant) seeds and those propagated vegetatively. The technique can be used as an alternative method for orthodox seed plants preservation in the *ex situ* conservation system. Although field and *in vitro* collection methods can be applied for the non-orthodox seed plants, a number of disadvantages possessed by these methods, especially in the tropics or the developing countries, deny their use for the establishment of a long-term germplasm collection. Successful implementation of the cryopreservation technique is supported by the development of protocols, which are able to provide a high recovery rate for species understudy, using vitrification based methods which are simple, economical, applicable to complex organs, and able to implement a high number of explants per experiment. The availability of infrastructures including *in vitro* culture laboratories, continue supply of liquid nitrogen is highly supporting the use of cryopreservation technique in Indonesia.

**Key words:** Cryopreservation technique, long term preservation plant germplasm.

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan wilayah yang padat keragaman hayatinya termasuk keragaman flora. Dengan luas area 1,3% luas daratan dunia, Indonesia menyimpan 11% spesies tumbuhan dunia (FWI-GFW 2001). Kekayaan ini sebagian besar tersimpan dalam hutan-hutan sebagai spesies liar dan lainnya berada pada lahan-lahan pertanian serta perkebunan yang tersebar pada lebih kurang 17 ribu pulau.

Sejalan dengan meningkatnya jumlah penduduk, eksploitasi hutan yang tak terkendali, serta meningkatnya jumlah varietas unggul hasil pemuliaan tanaman, kekayaan keragaman hayati yang tersedia dewasa ini mengalami penyusutan dengan sangat pesat. Berbagai pendekatan telah diupayakan guna mempertahankan keragaman yang ada agar dapat digunakan secara ber-

kelanjutan dari generasi ke generasi. Selain pendekatan konservasi *in situ* yang berupaya melestarikan organisme beserta lingkungannya dalam bentuk hutan lindung, taman nasional, dan sebagainya, pendekatan *ex situ* yang berupaya melestarikan organisme diluar habitat aslinya telah pula diupayakan dalam beberapa bentuk termasuk kebun raya, koleksi lapang maupun bank gen.

Dari 6 juta koleksi *ex situ* yang dikelola di berbagai bank gen di dunia, 39% di antaranya berasal dari tanaman biji-bijian dan 15%-nya tanaman kacang-kacangan. Kelompok tanaman lain seperti golongan sayuran, umbian, rerumputan, dan lain-lain, berjumlah 8% atau kurang (Scarascia-Mugnozza dan Perrino 2002). Data statistik tersebut dapat dimengerti karena kedua kelompok tanaman, serealialia dan kacang-kacangan, umumnya berbiji orthodox sehingga memungkinkan penyimpanan dengan metode konvensional (penyimpanan biji) yang sudah lama berkembang. Penggunaan metode koleksi lapang, *in vitro* serta kriopreservasi untuk pelestarian tanaman golongan lainnya yang umumnya berbiji rekalsitran, semirekalsitran atau berbiak vegetatif, membutuhkan lahan yang luas, tenaga kerja yang tinggi (untuk koleksi lapang dan *in vitro*), serta penelitian dan pengujian (untuk koleksi *in vitro* dan kriopreservasi).

Kriopreservasi, suatu metode penyimpanan eksplan pada suhu ekstrim dingin, biasanya pada nitrogen cair (-196°C) (Kantha dan Engelmann 1994), telah digunakan pada tanaman sejak tahun 1937 (Luyet 1937). Akan tetapi penelitian dan pemanfaatannya secara rutin berlangsung intensif mulai dekade 1990an. Diawal dekade 1990an kriopreservasi telah diteliti pada lebih dari 100 spesies tanaman (Takagi 2000). Saat ini lebih dari 3000 aksesori dari 20 genera tanaman telah disimpan secara kriopreservasi di beberapa negara di dunia (Reed 2002).

## POTENSI PLASMA NUTFAH TANAMAN DI INDONESIA SERTA PELESTARIANNYA

Keragaman flora Indonesia tidak hanya terkandung dalam jumlah spesies tanaman yang ada tetapi juga jumlah subspecies, varietas sampai pada keragaman individu dalam populasi baik liar maupun

domestikasi. Termasuk dalam keragaman dimaksud adalah golongan pohon hutan (jati/*Tectona grandis* Linn. f, meranti/*Shorea* sp.), tanaman industri (coklat/*Theobroma cacao* L., kopi/*Coffea* sp.), tanaman pangan berupa buah-buahan (keluwih/*Artocarpus camasi* (Noel vitmayer), rambutan/*Nephellium lappaceum* L.), serealialia (padi/*Oryza sativa* L., jagung/*Zea mays* L.), umbi-umbian (ubi/*Dioscorea* sp., ubi jalar/*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), kacang-kacangan (kedelai/*Glycinea soya* L., kecapi/*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C.) dan sayuran (melinjo/*Gnetum gnemon* L., bayam/*Amaranthus* sp.) maupun tanaman obat-obatan (buah merah/*Pandanus conoideus* Lam, Jahe/*Zingiber officinale* Rosc.), dan tanaman hias (mawar/*Rosa* sp., puring/*Codiaum* sp.).

Potensi keragaman spesies flora Indonesia dapat disimak dari beberapa contoh berikut: dari keseluruhan jumlah spesies yang menyebar di dunia, 25% spesies manggis (*Garcinia* sp.), 58% spesies mangga (*Mangifera* sp.) (Bompard dan Kostermans 1985), dan 66% spesies salak (*Salacca* spp.) ditemukan di Indonesia. Lima ribu dari 50 ribu spesies anggrek di dunia terdapat di Indonesia (Parnata 2005). Sedikitnya 1.300 tumbuhan obat (Zuhud 1998), dari sekitar 2500 jenis yang telah dimanfaatkan di dunia (EISAI 1995) teridentifikasi di Indonesia. Lebih dari 120 di antaranya telah didiskripsi secara morfologi, taksonomi, kandungan kimia, khasiat, cara pemanfaatan, dan sebagainya (Dalimartha 1999, 2003a, 2003b).

Dari berbagai golongan tanaman di atas, dapat dilihat bahwa sebagian besar (selain serealialia dan kacang-kacangan) memiliki biji non ortodox atau berbiak secara vegetatif. Dengan demikian, metode pelestarian yang sesuai adalah kebun koleksi, koleksi *in vitro* atau kriopreservasi.

Di Indonesia, selain penyimpanan benih untuk padi, jagung, dan kacang-kacangan, koleksi lapang telah dilakukan pada beberapa instansi untuk mempertahankan berbagai jenis tanaman. Sebagai contoh 233 kultivar pisang dikoleksi oleh Dinas Pertanian Daerah Istimewa Yogyakarta (Satuhu dan Supriyady 2005). Koleksi plasma nutfah kelapa sawit yang relatif lengkap dikelola oleh Pusat Penelitian Kelapa Sawit, Medan (PPKS 2003).

Penelitian pemanfaatan kultur *in vitro* serta kriopreservasi untuk pelestarian plasma nutfah tanaman di Indonesia dimulai hampir bersamaan, yaitu tahun 1992 dan 1993 (Sudarmonowati 2000). Sejauh ini pengembangan teknik perbanyakan klonal berbagai jenis tanaman termasuk purwoceng (*Pimpinella pruatjan* (Mariska *et al.* 1996), temu mangga (*Curcuma mangga*) (Hutami dan Purnamaningsih 2003), anggrek

(Sandra 2003) serta uji pemanfaatan pertumbuhan minimal menggunakan berbagai media (Rahayu dan Sunarlim 2003) telah dilaporkan. Beberapa metode kriopreservasi telah diuji pada 17 spesies tanaman termasuk tanaman hutan, hortikultura, dan tanaman pangan (Prasetyorini 1999, Roostika 2003, Sudarmonowati 2000). Sekalipun dicapai suatu kisaran tingkat keberhasilan hidup (*survival*), tingkat pertumbuhan kembali (*shoot recovery*) baru dilaporkan pada tanaman ubi kayu (*Manihot utilissima*) sebesar 50% (Roostika *et al.* 2005).

## **BEBERAPA PERMASALAHAN PADA KOLEKSI LAPANG DAN *IN VITRO* KHUSUSNYA DI NEGARA-NEGARA BERKEMBANG**

### **Kemungkinan Kehilangan Plasma Nutfah pada Koleksi Lapang**

Mempertahankan plasma nutfah melalui koleksi lapang memungkinkan karakterisasi dan evaluasi tanaman serta memudahkan program persilangan melalui ketersediaan bunga/serbuk sari secara cepat. Selain itu, proses reproduksi secara klonal dapat mempertahankan kesamaan genetik (*true to type*) materi. Namun demikian, metode koleksi ini sangat rawan punah, terutama di negara-negara berkembang, yang dapat disebabkan oleh berbagai faktor, seperti hama/penyakit (baik di lapang maupun dalam penyimpanan), iklim yang ekstrim, konsumsi benih yang diperuntukkan bagi musim tanaman berikutnya oleh petani akibat bencana kelaparan/panen yang gagal, kebakaran lahan, konflik sosial, serta perubahan pemanfaatan lahan yang tadinya untuk koleksi plasma nutfah (Acheampong 1996, Morales *et al.* 1996, Ng dan Ng 1996, Taylor 1996a, Taylor dan Murikami 2000).

### **Lahan Koleksi dan Biaya Operasional**

Koleksi lapang membutuhkan lahan penanaman yang luas terlebih bila diperlukan duplikasi untuk pengamanan koleksi. Di lain pihak pertambahan penduduk yang pesat menghendaki pembangunan sarana pemukiman, pusat perbelanjaan, sarana rekreasi, pusat perkantoran, dan sebagainya., yang berdampak pada konversi lahan koleksi. Soemowoto (2003) mengemukakan bahwa koleksi tanaman hortikultura yang pernah ada di Pasar Minggu, Jakarta, punah karena pembangunan kompleks perkantoran Departemen Pertanian. Hal yang sama menjadi penyebab hilangnya sebagian besar koleksi tanaman ekonomi di Bogor. Tingginya biaya operasional berkaitan dengan kebutuhan tenaga kerja yang besar untuk penanaman, pelabelan, pemeliharaan, dan pemanenan yang dilaku-

kan secara berkala (setiap musim) terutama pada tanaman setahun.

### **Kemungkinan Perubahan Genetik Materi pada Koleksi *In Vitro***

Koleksi plasma nutfah tidak hanya bermaksud mempertahankan hidupnya materi tetapi juga kesamaan susunan genetik materi sebelum dan sesudah koleksi. Hal ini memungkinkan pemanfaatannya sesuai potensi genetik yang dimiliki dikemudian hari. Koleksi plasma nutfah secara *in vitro* memungkinkan ketersediaan materi sepanjang tahun, proteksi terhadap risiko lingkungan dan patogen, kemudahan dalam duplikasi materi untuk disimpan pada lokasi berbeda, observasi materi secara berkala terhadap penurunan vigor, kualitas, serta serangan patogen (Dodds 1991, Kartha 1985, Taylor dan Murikami 2000). Namun demikian, penggunaan kultur *in vitro* terutama aplikasi pertumbuhan lambat (*slow growth*) untuk menunda periode subkultur dengan cara mengubah kondisi pertumbuhan optimum atau menginduksi kondisi stres pada media kultur, dapat menyebabkan mutasi atau variasi somaklonal (Scowcroft 1984). Harding (1994) melaporkan bahwa penggunaan manitol dalam upaya pertumbuhan lambat kentang setelah enam bulan menunjukkan perubahan morfologi yang berkorelasi dengan hiper metilasi (metilasi = penambahan gugusan methyl pada ujung utas DNA yang direplikasi) pada DNA inti dan RNA ribosom yang disimpulkan sebagai tanggapan terhadap kondisi kultur yang menekan. Hasil penelitian Harding (1994) dapat berimplikasi pada pemanfaatan kultur jaringan dalam konservasi genetik tanaman kentang yang berbiak secara vegetatif, karena status metilasi dapat diturunkan dan mengubah fenotipe generasi berikut.

### **Tingkat Kontaminasi Koleksi *In Vitro***

Tingginya tingkat kontaminasi pada koleksi *in vitro* di negara tropis kemungkinan berkaitan dengan kondisi iklim yang memudahkan perkembangan patogen selain sterilisasi yang kurang memadai baik terhadap materi, bahan, dan alat maupun ruang koleksi. Taylor (1996b) melaporkan bahwa di negara-negara Pasifik Selatan, kontaminasi koleksi *in vitro* meningkat pada saat musim hujan. Tingginya tingkat kontaminasi mengharuskan koleksi materi dalam jumlah relatif tinggi untuk mengurangi kemungkinan hilangnya materi dalam koleksi secara *in vitro*.

### **Ketersediaan Tenaga Listrik yang Konsisten**

Koleksi *in vitro* menghendaki adanya masukan energi maupun voltase listrik yang konsisten. Permasalahan menyangkut rusaknya peralatan laboratorium,

meningkatnya kontaminasi atau pertumbuhan yang tidak normal dari koleksi *in vitro* yang terjadi karena tidak konstannya aliran listrik. Di negara-negara berkembang, terputusnya aliran listrik serta perubahan voltase merupakan hal yang sering terjadi.

### **Teknisi dan Biaya Operasional pada Koleksi *In Vitro***

Kegiatan laboratorium seperti eliminasi virus dan patogen lainnya, diseksi eksplan, sterilisasi peralatan, bahan dan materi serta kultivasi secara berkala dari koleksi *in vitro* memerlukan tenaga teknis yang terlatih dan dalam jumlah yang memadai. Penyiapan tenaga teknis serta pelaksanaan kultivasi secara berkala memerlukan biaya yang besar terutama dengan semakin bertambahnya koleksi. Upaya mengurangi biaya operasional melalui pertumbuhan minimal dapat memperpanjang periode subkultur satu sampai dua tahun. Meskipun demikian dalam jangka panjang hal ini akan tidak ekonomis.

### **PERLUNYA KRIOPRESERVASI**

Penggunaan metode kriopreservasi dapat mengatasi masalah keterbatasan ruang melalui penyimpanan dalam tangki (*cryo container*). Sebagai contoh sebuah tabung kriopreservasi yang memuat enam rak dengan kapasitas 11 kotak per rak dan 120 tabung per kotak akan menampung 7920 tabung. Apabila satu tabung diisi dengan 20 eksplan tanaman koleksi maka satu *container* dapat menampung sekitar 158 ribu eksplan.

Melalui penyimpanan pada nitrogen cair (suhu -196°C), koleksi materi kriopreservasi dapat bertahan hingga waktu tak terbatas dan diasumsikan dapat menjaga konsistensi genetik ketika dipanaskan kembali. Hal ini dimungkinkan karena pada suhu yang ekstrim rendah, seluruh proses biologis materi berada pada kondisi *stand still* atau berlangsung sangat lambat (Kartha dan Engelmann 1994). Pertumbuhan kembali (*recovery*) setelah kriopreservasi akan berlangsung dari hanya sejumlah kecil sel yang mampu bertahan hidup (*survive*), dengan demikian akan dihasilkan tanaman *in vitro* bebas virus dan patogen lainnya bahkan melebihi efektivitas kultur meristem (Brison *et al.* 1997, Helliot *et al.* 2002). Selanjutnya koleksi kriopreservasi dapat mengurangi ketergantungan pada aliran listrik karena nitrogen cair dapat ditambahkan secara manual. Kemungkinan penyimpanan untuk jangka waktu tak terhingga dengan kriopreservasi (dengan catatan masukan nitrogen cair dilakukan secara rutin) akan meniadakan perlunya penanaman kembali atau subkultur, memungkinkan pemanfaatan yang efisien

dari tenaga teknis yang terbatas serta mengurangi biaya operasional sebagaimana terjadi pada koleksi lapang dan koleksi *in vitro*. Kelebihan lain dari kriopreservasi adalah koleksi dapat dilakukan pada berbagai eksplan meliputi protoplas, suspensi sel, kalus, tunas/pucuk, embrio, serbuk sari hingga biji (Bajaj 1995, Ng dan Daniel 2000; Reinhoud *et al.* 2000, Stanwood 1985, Towill dan Walters 2000).

Memahami keterbatasan dan kelebihan masing-masing metode koleksi, maka koleksi lapang dan koleksi *in vitro* umumnya untuk koleksi jangka pendek/koleksi aktif, yaitu untuk pertukaran plasma nutfah atau pemanfaatan langsung, sedangkan kriopreservasi untuk koleksi jangka panjang/koleksi dasar.

## METODE, TEKNIK PENGEMBANGAN, DAN PENGUJIAN PROTOKOL KRIOPRESERVASI

### Beberapa Metode Umum Kriopreservasi

Penelitian dan pemanfaatan kriopreservasi dalam koleksi plasma nutfah tanaman meningkat pesat sejak dikembangkan metode sederhana seperti vitrifikasi oleh para peneliti Jepang dan USA (Langis *et al.* 1989, Uragami *et al.* 1989), enkapsulasi-dehidrasi oleh para peneliti Perancis (Dereuddre *et al.* 1990) serta droplet (Schäfer-Menuhr *et al.* 1994) oleh para peneliti Jerman. Metode tersebut dikenal dengan metode berbasis vitrifikasi (Engelmann 2000). Vitrifikasi adalah pembentukan struktur menyerupai kaca (*meta-stable glass*) pada suhu yang sama dengan atau di bawah titik beku larutan tertentu. Meskipun metode lama yakni pendinginan lambat atau pendinginan bertahap tetap digunakan, pemanfaatannya hanya terbatas pada beberapa laboratorium misalnya di USA (Reed 2002) dan CIAT-Columbia (Escobar *et al.* 1997).

Terbatasnya penggunaan metode lama disebabkan karena beberapa alasan termasuk tingkat kerumitan prosedur, penggunaan eksplan yang terbatas, kurang ekonomis, serta kurang sesuai untuk eksplan yang kompleks seperti tunas/pucuk atau embrio.

Spesifikasi metode vitrifikasi dibandingkan dengan kedua metode lainnya termasuk pemanfaatan larutan vitrifikasi/dehidrasi yakni campuran beberapa krioprotektan (sukrosa, gliserol, etilen glicol-EG, dime-tilsulfocida-DMSO) yang dikenal dengan, *plant vitrification solution*-PVS1, 2, 3, dan 4. Sebagai contoh, PVS2 mengandung 13,7% (w/v) sukrosa, 30% (w/v) gliserol, 15% (w/v) EG, dan 15% (w/v) DMSO (Sakai *et al.* 1990). Dalam metode enkapsulasi-dehidrasi, eksplan dibungkus dengan kapsul gel alginat sebelum dehidrasi dengan menggunakan eksikator atau pada *laminar flow box*. Pada metode droplet, eksplan di-

bungkus dengan tetesan krioprotektan DMSO pada aluminium foil sebelum dimasukkan kedalam nitrogen cair. Dalam pengembangan lebih lanjut, spesifikasi tiap metode dapat dikombinasikan untuk mendapatkan protokol yang sesuai pada tanaman tertentu (Hirai dan Sakai 2003, Leunufna dan Keller 2005, Mandal 2000, Pennycooke dan Towill 2001).

Tahapan lengkap suatu protokol kriopreservasi (contoh pada metode vitrifikasi) umumnya meliputi perlakuan/pengkondisian tanaman sumber eksplan, kultur awal, pemuatan (*loading*), dehidrasi, pendinginan pada nitrogen cair, pemanasan kembali, pelepasan muatan/pencucian serta kultivasi lanjut untuk pengamatan pertumbuhan kembali (Steponkus *et al.* 1992). Meskipun demikian, telah dikembangkan juga beberapa metode sederhana yang hanya menggunakan sebagian tahapan protokol di atas. Termasuk dalam metode tersebut adalah pendinginan dua tahap (Reinhoud *et al.* 2000), desikasi, *pregrowth*, dan *pregrowth*-desikasi (Engelmann 2000). Penyederhanaan protokol dapat mengurangi kerusakan pada sel-sel eksplan sebagai akibat berbagai perlakuan, dengan tetap memberikan perlindungan maksimal pada sel terhadap suhu ekstrim dingin, yang dinyatakan dengan persentase pertumbuhan kembali yang cukup memadai, di samping sedikit penghematan terhadap waktu dan biaya operasional.

### Teknik Pengembangan Protocol

Pengembangan protokol pada laboratorium yang baru memulai penelitian kriopreservasi dapat dilakukan dengan mencoba berbagai metode/protokol yang telah lebih dulu dikembangkan pada tanaman tertentu. Berbagai contoh metode/protokol yang telah digunakan untuk tanaman tropis dikemukakan oleh Takagi (2000). Dalam pelaksanaannya ada ketergantungan genotipe (Reed 2000), perbedaan dalam fasilitas laboratorium (Reed *et al.* 2001), serta keterbatasan informasi yang disampaikan dalam publikasi (Towill 2002) terhadap keberhasilan penggunaan protokol yang sama.

Cara pengembangan lain dapat dilakukan dengan metode *trial and error*, yakni mencoba berbagai protokol secara acak setelah mendalami pustaka secara umum (Leunufna dan Keller 2003), baik untuk tanaman yang telah maupun belum pernah diteliti. Beragam perlakuan dapat dikenakan pada tiap tahap protokol termasuk jenis dan konsentrasi krioprotektan, periode aplikasi serta perlakuan lainnya. Verifikasi protokol (dengan ulangan) dapat dilakukan setelah mendapatkan protokol yang dianggap memadai (Leunufna 2004, Leunufna dan Keller 2005). Dalam tahap ini dapat pula dikombinasikan dengan perlakuan-perlakuan

lain yang diduga dapat lebih meningkatkan pertumbuhan setelah pemanasan kembali.

Pengembangan protokol secara lebih sistematis dapat dilakukan dengan mempelajari dan memahami penyebab kerusakan pada organel sel atau jaringan materi yang digunakan pada berbagai tahap perlakuan pada protokol, misalnya dengan menggunakan mikroskop elektron (Helliot *et al.* 2003, Leunufna 2004) atau dengan mempelajari pengaruh radikal-radikal bebas (Benson 1990, Dumet dan Benson 2000). Hal ini memungkinkan eliminasi dari tahapan tertentu demi penyederhanaan protokol dengan tetap memberikan perlindungan pada eksplan. Pemahaman terhadap kerusakan sel baik secara fisik maupun biokimia dapat diuji secara empiris dengan memperhatikan persentase pertumbuhan kembali setelah penyimpanan dalam nitrogen cair.

### Evaluasi Protokol

Selain berbagai aspek pengembangan protokol terutama menyangkut perubahan fisik maupun biokimia sel yang masih perlu mendapat perhatian penelitian dalam rangka pengembangan protokol, tingkah laku materi setelah kriopreservasi terutama menyangkut konsistensi genetik. Pentingnya aspek ini telah melahirkan suatu cabang ilmu biologi *Cryobionomics* yang diusulkan oleh Harding (2003), yakni ilmu yang mempelajari tentang sifat dan habitat organisme hasil kriopreservasi setelah diintroduksi kembali ke lingkungan semula. Secara definisi, kriopreservasi diasumsikan menjaga kesamaan genetik sebelum dan sesudah penyimpanan dalam nitrogen cair. Akan tetapi karena protokol kriopreservasi melibatkan berbagai perlakuan termasuk memanfaatkan kultur *in vitro* maupun krioprotektan yang memungkinkan terjadinya mutasi atau variasi somaklonal, maka materi hasil kriopreservasi perlu dibuktikan stabilitas genetiknya. Pengujian stabilitas genetik setelah kriopreservasi sekaligus merupakan validasi terhadap protokol yang dikembangkan. Validasi protokol melalui pengujian materi hasil kriopreservasi dapat dilakukan pada tingkat fenotipe, biokimia (protein/enzim), kromosom (genom, jumlah kromosom), maupun pada tingkat molekuler (DNA, RNA). Untuk memungkinkan pertukaran protokol secara nasional, regional atau internasional, protokol yang dikembangkan dapat diuji validitasnya pada beberapa laboratorium atau dapat juga didahului dengan suatu lokakarya penyeragaman teknik pengembangan protokol (Reed *et al.* 2001).

## PEMANFAATAN KRIOPRESERVASI SECARA RUTIN

### Penyediaan Nitrogen Cair

Sebagai wadah penyimpan materi kriopreservasi, ketersediaan nitrogen cair (NC) secara rutin merupakan hal yang sangat penting. Nitrogen cair dapat diperoleh melalui pendinginan udara (yang mengandung 21% oksigen -O<sub>2</sub> dan 79% nitrogen -N<sub>2</sub>) serta pemisahan O<sub>2</sub> dari N<sub>2</sub>. Ketersediaan NC pada laboratorium kriopreservasi dapat diperoleh dari dua sumber: pertama pembuatan sendiri dengan mesin berkapasitas relatif kecil. Saat ini beberapa model mesin produksi NC telah dipromosikan dengan berbagai kemampuan (<http://www.stirling.nl/sp/sp3.html>), misalnya dengan kapasitas penampungan tangki antara 200-2000 liter. Cara kedua memperoleh NC secara rutin dapat dilakukan dengan bekerja sama dengan instansi lain. Selain untuk kriopreservasi, NC diperlukan untuk berbagai kegunaan termasuk dalam bidang kedokteran, industri maupun laboratorium bioteknologi lainnya. Sebagai contoh pabrik pupuk petrokimia gresik menghasilkan nitrogen cair dengan kapasitas 800 t/tahun (PT Petrokimia Gresik 2002). Produk ini digunakan dalam industri kimia misalnya sebagai bahan baku amoniak, dan dalam industri pembersih peralatan pabrik (pipa dan tangki), pemadam kebakaran, industri listrik (lampu), dan lain-lain. Produk petrokimia gresik dapat sampai pada laboratorium kriopreservasi melalui beberapa distributor dan ditampung dalam tangki penampungan yang cukup besar untuk persediaan beberapa lama (misalnya 2 minggu) tergantung jumlah konsumsi dan laju penguapan pada tangki penyimpanan sampel. Komitmen yang kuat untuk menyediakan NC secara periodik sangat diperlukan untuk keselamatan dan kelanggengan koleksi. Pilihan lain adalah dengan menyiapkan mesin produksi sendiri sebagai cadangan untuk penyelamatan jika sewaktu-waktu terjadi kemacetan suplai NC dari distributor.

### Laboratorium, Fasilitas, dan Keamanan Kriopreservasi

Laboratorium kriopreservasi merupakan bagian yang terkait dengan laboratorium kultur jaringan tanaman. Kultur *in vitro*, terutama untuk pemanfaatan eksplan meristem, memberikan kemudahan perbanyakan materi untuk digunakan dalam kriopreservasi, ketersediaan materi (eksplan) setiap waktu sepanjang tahun, kemudahan memanipulasi planlet sumber eksplan (misalnya dengan perlakuan aklimatisasi), serta kemudahan menumbuhkan kembali materi hasil kriopreservasi (Reed 2001). Materi kriopreservasi dapat juga diperoleh langsung dari tanaman *ex vitro*, namun praktek ini umumnya hanya berhasil baik pada beber-

apa tanaman daerah *temperate* yang memiliki sifat tahan dingin. Selain itu, pertumbuhan kembali secara *ex vitro* relatif sulit (Towill 2002).

Di Indonesia, laboratorium kultur *in vitro* telah berkembang dengan baik pada berbagai institusi termasuk Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Tanaman (BB-Biogen), Pusat Penelitian dan Pengembangan-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (R & D-LIPI), Balai Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) serta berbagai universitas dan instansi lainnya. Hal ini merupakan faktor pendukung bagi perkembangan penelitian dan pemanfaatan kriopreservasi secara rutin.

Ruang koleksi kriopreservasi memerlukan ventilasi yang baik guna mencegah/mengurangi risiko bila terjadi kecelakaan yang berakibat penguapan NC secara berlebihan. Evaporasi NC akan mengurangi konsentrasi oksigen ( $O_2$ ) di udara. Menghirup udara dengan kandungan oksigen kurang dari 19,5% akan menyebabkan pusing-pusing, muntah, tidak sadarkan diri hingga kematian.

Koleksi rutin kriopreservasi memerlukan beberapa perlengkapan selain mesin produksi dan/atau kontainer penampung NC. Tabung koleksi terdapat dalam beberapa ukuran sesuai kebutuhan serta dana yang tersedia. Sebagai contoh, tabung untuk keperluan transfer memiliki diameter antara 18,5-38,1 cm, tabung yang *portable* untuk penyimpanan jangka pendek berdiameter 36,8-55,9 cm, dan yang bersifat permanen untuk penyimpanan jangka panjang berdiameter 40,6-100,3 cm (Brockbank *et al.* 2004). Sistem penyusunan eksplan dalam tabung penyimpan dapat dilakukan antara lain dengan sistem rak yang tersusun dari kotak-kotak dengan masing-masing sekitar 100 sel tempat peletakan tabung krio berisi spesimen. Koleksi dapat dilengkapi dengan sistem monitoring terhadap suhu dan kondisi NC dalam tabung serta alarm dan pengisian otomatis secara elektronis. Bila terjadi pemadaman listrik, aktivitas tersebut perlu dilakukan secara manual untuk kelanggengan koleksi. Beberapa perlengkapan lain berupa kaca mata atau pelindung muka serta sarung tangan yang longgar, kedap air, dan tahan panas diperlukan untuk keselamatan kerja pada saat memasukkan atau mengeluarkan eksplan dari tabung koleksi.

Karena koleksi kriopreservasi ditujukan untuk penyimpanan dalam jangka waktu lama yang dapat meliputi pergantian peneliti, teknisi, dan sebagainya, maka pencatatan data koleksi sangat penting. Sedikitnya ada empat informasi penting dikemudian hari (Simione 1998), yaitu metode preservasi yang digunakan, lokasi dan identifikasi materi yang disimpan, waktu (tanggal/

bulan/tahun) preservasi, dan jumlah replikasi. Beberapa contoh format pencatatan data koleksi kriopreservasi dikemukakan oleh Simione (1998).

## PENUTUP

Sebagai satu-satunya metode konservasi jangka panjang yang tersedia bagi tumbuhan berbiji non-ortodox, penerapan kriopreservasi di Indonesia merupakan hal yang sangat diperlukan, mengingat potensi plasma nutfah tumbuhan yang sebagian besar berbiji rekalsitran, semi-rekalsitran atau berbiak vegetatif, yaitu pohon hutan, buah-buahan, umbi-umbian, tanaman hias, dan tanaman obat-obatan.

Kondisi infrastruktur termasuk kemungkinan suplai nitrogen cair serta peralatan lainnya, adanya laboratorium kultur jaringan tanaman pada berbagai instansi serta dimulainya penelitian pengembangan protokol kriopreservasi, sangat memungkinkan bagi pemanfaatan metode ini di Indonesia.

Pemanfaatan kriopreservasi dalam koleksi rutin plasma nutfah tumbuhan di Indonesia dapat dimulai dengan penggunaan peralatan sederhana dan lebih ekonomis untuk spesies dengan tingkat pertumbuhan kembali (*shoot recovery*) yang telah cukup memadai sambil terus mengintensifkan penelitian pengembangan protokol yang memungkinkan pertumbuhan kembali yang memadai bagi spesies lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acheampong, E. 1996. *In vitro* genebank management of clonally propagated crops under minimal conditions. In Engelman, F. (Ed.). Management of Field and *In Vitro* Germplasm Collections. IPGRI-FAO, Cali, Columbia, p. 75-75.
- Bajaj, Y.P.S. 1995. Cryopreservation of medicinal and aromatic plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 1:419-434.
- Benson, E.E. 1990. Free radical damage in stored plant germplasm. IBPGR, Rome.
- Bompard J.M. and A.J.G.H. Kostermans. 1985. Wild Mangifera species in Kalimantan, Indonesia. In Mehra K.L. and S. Sastraprja (Eds.). Proceedings of the International Symposium on South East Asian Plant Genetic Resources. Lembaga Biologi Nasional, Bogor. p. 172-174.
- Brison, M., De Boucaud M.T., A. Pierronnet, and F. Dosba. 1997. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv *Punus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. *Plant Sci.* 123:189-196.
- Brockbank, K.G.M., J.C. Covault, and M.J. Taylor. 2004. Cryopreservation manual, a guide to cryopreservation techniques. Thermo Electron Corporation.

- Dalimartha, S. 1999.** Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid I. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- Dalimartha, S. 2003a.** Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid II. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- Dalimartha, S. 2003b.** Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid III. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- Dereuddre, J., C. Scottez, Y. Arnaud, and M. Duron. 1990.** Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. 'Beurre Hardy') *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: Effects of previous cold hardening. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Paris* 310:317-323.
- Dodds, J.H. 1991.** Conservation of plant genetic resources-the need for tissue culture. In Dodds, J.H., Chapman, and Hall (Eds.). *In Vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources*. University press, Cambridge. p. 1-9.
- Dumet, D. and E.E. Benson. 2000.** The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/dessicated plant germplasm. In Engelman, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Current Research Progress and Application*. JIRCAS International Agriculture Series 8:43-56.
- EISAI. 1995.** Medical Herbs Index in Indonesia. Jakarta.
- Engelmann, F. 1997.** Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Gen. Res. Newsletter* 112:9-18.
- Engelmann, F. 2000.** Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In Engelman, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Current Progress and Application*. JIRCAS International Agriculture Series 8:8-20.
- Escobar, R.H., G. Mafla, and W.M. Roca. 1997.** Methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Rep.* 16:474-478.
- Forest Watch Indonesia/Global Forest Watch. 2001.** Potret keadaan hutan Indonesia, Bogor, Indonesia Forest Watch Indonesia dan Washington D.C. Global Forest Watch Edisi Ketiga.
- Harding, K. 1994.** The methylation status of DNA derived from potato plants recovered from slow growth. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* 37:31-38.
- Harding, K. 2003.** Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. *CryoLetters* 25:3-22.
- Helliot, B., B. Panis, Y. Poumay, and R. Swennen. 2002.** Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep.* 20(12):1117-1122.
- Helliot, B., R. Swennen, Y. Poumay, E. Erison, P. Lepoivre, and B. Panis. 2003.** Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Rep.* 21:690-698.
- Hirai, H. and A. Sakai. 2003.** Simplified cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) by optimising conditions for osmoprotection. *Plant Cell Rep.* 21:961-966.
- Hutami, S. dan R. Purnamaningsih. 2003.** Perbanyakan klonal temu mangga (*Curcuma mangga*) melalui kultur *in vitro*. *Buletin Plasma Nutfah* 9(1):39-44.
- Kartha, K.K. 1985.** Meristem culture and germplasm preservation. In Kartha K.K. (Ed.). *Cryopreservation of Cells and Organs*. CRC Press Inc. Florida. p. 115-134.
- Kartha, K.K., and F. Engelmann. 1994.** Cryopreservation and germplasm storage. In Dodds, J.H., Chapman, and Hall (Eds.). *In Vitro Methods for Conservation of Plant Genetic Resources*. Cambridge. p. 195-230.
- Langis, R., B. Schnabel, E.D. Earle, and P.L. Steponkus. 1989.** Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification. *CryoLetters* 10:421-428.
- Leunufna, S. 2004.** Improvemanant of the *in vitro* maintenance and cryopreservation of yams (*Dioscorea* spp.). Dissertation. Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg. Verlag Dr. Köster, Berlin.
- Leunufna, S. and E.R.J. Keller. 2003.** Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Rep.* 21:1159-1166.
- Leunufna, S. and E.R.J. Keller. 2005.** Cryopreservation of yams using vitrification modified by including droplet method: Effects of cold acclimation and sucrose. *CryoLetters* 26(2):93-102.
- Luyet, B.J. 1937.** The vitrification of organic colloids and of protoplasts. *Biodinamica* 1:1-14.
- Mandal, B.B. 2000.** Cryopreservation of yams apices: A comparative study with three different techniques. *Cryopresevation of Tropical Plant Germplasm, Current Progress and Application*. IPGRI, Rome. p. 233-237.
- Mariska, I., R. Purnamaningsih, dan M. Kosmiatin. 1996.** Pertumbuhan biakan purwoceng pada beberapa media dasar. Prosiding Kongres Ilmu Pengetahuan Nasional IV. LIPI dan Dikti. Jakarta, 11-15 September 1995.
- Morales, S.R., M.G. Garrcia, M.M. Jomenez, and I.S. Ramos. 1996.** Establishment, maintenance and use under field conditions of cuban germplasm of tropical root and tuber crops, and banana and plantain. In Engelman, F. (Ed.). *Management of Field and In Vitro Germplasm Collections*. IPGRI-FAO, Cali, Columbia. p. 25-28.
- Ng, N.Q. and S.Y.C. Ng. 1996.** Yam field genebank management at IITA. In Engelman, F. (Ed.). *Management of Field and In Vitro Germplasm Collections*. IPGRI-FAO, Cali, Columbia. p. 16-18.
- Ng, N.Q. and I.O. Daniel. 2000.** Storage of pollen for long-term conservation of yam gentic resources. In Engel-

- mann, F. and H. Takagi (Eds.). Cryopresevation of Tropical Plant Germplasm, Current Progress, and Application. IPGRI, Rome. p. 136-139.
- Parnata, A.S. 2005.** Panduan Budidaya Perawatan Anggrek. Agromedia-Pustaka, Jakarta.
- Pennycooke, Jc, and L.E. Towill. 2001.** Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomoea batatas*) (L) Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 22:381-389.
- Prasetyorini. 1999.** Preservasi *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. Ex. Kurz. melalui teknik kultur *in vitro*. Thesis doctoral. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- PT Petrokimia Gresik. 2002.** PT Petrokimia Gresik Fertilizer Company. <http://www.petrokimia-gresik.com/chemicalproduct.asp>
- Pusat Penelitian Kelapa Sawit. 2003.** Pengelolaan *ex situ* dan database plasma nutfah kelapa sawit. *Warta Plasma Nutfah Indonesia* 14:8-12.
- Rahayu, S. and N. Sunarlim. 2003.** Konservasi tumbuhan obat langka purwoceng melalui pertumbuhan minimal. *Buletin Plasma Nutfah* 8(1):29-33.
- Reed, B.M. 2000.** Genotype considerations in temperate fruit crop cryopreservation. In Engelmann F. and H. Takagi (Eds.). Cryopresevation of Tropical Plant Germplasm, Current Progress and Application. IPGRI, Rome. p. 201-204.
- Reed, B.M. 2001.** Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters* 22:97-104.
- Reed, B.M. 2002.** Implementing cryopreservation for long-term germplasm preservation in vegetatively propagated species. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cryopreservation of Plant Germplasm II*(50):23-33.
- Reed, B.M., D. Dumet, J.M. Denoma, and E.E. Benson 2001.** Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: A pilot study using *Ribes* L. *Biodiversity and Conservation* 10(6):939-949.
- Reinoud, P.J., F. Van Iren, and J.W. Kijne. 2000.** Cryopreservation of undefferntiated plant cells. In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Current Progress and Application. IPGRI, Rome. p. 91-102.
- Roostika, I. 2003.** Studi penyimpanan kultur *in vitro* ubi jalar (*Ipomea batatas* (L.)) secara kriopreservasi. Thesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Roostika, I., I. Mariska, dan N. Sunarlim. 2004.** Penyimpanan ubi kayu (*Manihot utilissima*) secara kriopreservasi dengan teknik vitrifikasi. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 9(1):8-13.
- 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 Rep.* 9:30-33.
- Sandra, E. 2003.** Kiat mengatasi permasalahan kultur jaringan anggrek skala rumah tangga. Agromedia Pustaka.
- Satuhu, S. dan A. Supriyady. 2005.** Pisang, Budidaya Pengolahan dan Prospek Pasar. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Scarascia-Mugnozza, G.T. and P. Perrino. 2002.** The hystory of *ex situ* conservation and use of plant genetic resources. In Engels, J.M.M., V.R. Rao, A.H.D. Brown, and M.T. Jackson (Eds.). *Managing Plant Genetic Diversity*. CABI Publishing, Wallingford. p. 33-42.
- Schäfer-Menuhr, A., E. Müller, and G. Mix-Wagner. 1994.** Langzeitlagerung alter Kartoffelsorten durch kryokonservierung der meristeme in flüssigen Stickstoff. *Landbauforschung Völkenrode* 44:301-313.
- Scowcroft, W.R. 1984.** Genetic variability in tissue culture: Inpact on germplasm conservation and utilization. IBPGR, Rome.
- Simione, F.P. 1998.** Cryopreservation manual. Nucleon International Corp.
- Soemorwoto, O. 2003.** Pengantar. Dalam Resosudarmo, I.A.D. dan C.J. Pierce (Eds.). Masyarakat Hutan dan Perumusan Kebijakan di Indonesia. Yayasan Obor Indonesia.
- Stanwood, P.C. 1985.** Meristem culture and germplasm presservation. In Kartha, K.K. (Ed.). *Cryopreservation of Cells and Organs*. CRC Press Inc. Florida. p. 199-226.
- Steponkus, P.L., R. Langis, and S. Fujikawa. 1992.** Cryopreservation of plant tissue by vitrification. *Advances in Low-temperature Biology* 1:1-61.
- Sudarmonowati, E. 2000.** Cryopreservation of tropical plants: Current research status in Indonesia. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Current Progress and Application*. IPGRI, Rome. p. 291-296.
- Takagi, H. 2000.** Recent development in cryopreservation of shoot apices of tropical species. *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Current Progress and Application*. JIRCAS International Agriculture Series 8:330-333.
- Taylor, M. 1996a.** Filed conservation of root and tuber crop in the South Pacific. Engelman, F. (Ed.). *Management of Field and In Vitro Germplasm Collections*. IPGRI-FAO, Cali, Columbia. p. 13-15.
- Taylor, M. 1996b.** *In vitro* conservation of root and tuber crop in the South Pacific. In Engelman, F. (Ed.). *Management of Field and In Vitro Germplasm Collections*. IPGRI-FAO, Cali, Columbia. p. 93-95.
- Taylor, M. and T. Murikami. 2000.** Current status and cryopreservation research and future perspectives of its application in the South Pacific. In Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm, Current Research Progress and Application*. JIRCAS International Agriculture Series 8:330-333.

- Towill, L.E. 2002.** Cryopreservation of plant germplasm: Introduction and some observation. *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cryopreservation of Plant Germplasm* II(50):3-21.
- 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*. JIRCAS International Agriculture Series 8:115-126.
- Uragami, A., A. Sakai, M. Nagai, and T. Takahashi. 1989.** Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Rep.* 8:418-421.
- Zuhud, E.A.M. 1998.** Mencari nilai tambah potensial hasil hutan non kayu tumbuhan obat berbasiskan pemberdayaan masyarakat tradisional sekitar hutan. Tidak dipublikasi.
-