

Teknologi Kriopreservasi untuk Konservasi Plasma Nutfah Kopi dan Kakao

Sulistiyani Pancaningtyas¹⁾

¹⁾Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman 90 Jember 68118

Teknik kriopreservasi merupakan cara menyimpan organisme hidup pada suhu yang sangat rendah, sehingga dapat dipertahankan viabilitasnya selama bertahun-tahun. Faktor penting yang harus diperhatikan dalam kriopreservasi diantaranya adalah pemilihan bahan *cryoprotectant* yang tepat, diantaranya yang sering digunakan adalah *dimethyl sulfoxide* (DMSO dan *glyserol*). Faktor penting lain yang perlu dipertimbangkan dalam teknik kriopreservasi adalah fasilitas penyimpanan, jaminan keamanan dan keselamatan, dan pendokumentasian eksplan yang disimpan (manajemen database).

Perkembangan bioteknologi tanaman selama dekade terakhir menunjukkan kemajuan yang pesat, di antaranya berkembang teknologi penyimpanan organ atau jaringan tanaman untuk pelestarian plasma nutfah yang dikenal dengan istilah kriopreservasi. Kriopreservasi merupakan teknologi penyimpanan spesimen biologis dalam jangka waktu yang lama pada suhu yang rendah (-196°C) dalam nitrogen cair sehingga pada kondisi tersebut metabolisme jaringan atau organ tanaman akan terhenti namun dapat dipulihkan kembali setelah proses pemulihan. Penerapan teknologi ini untuk pelestarian plasma nutfah yang termasuk jenis konservasi *ex situ* atau konservasi sumber daya genetik di luar habitat alaminya.

Untuk kriopreservasi tanaman, beberapa prosedur *cryogenic* telah disederhanakan seperti vitrifikasi, pengeringan-udara dan teknik enkapsulasi-dehidrasi sehingga jumlah spesies tanaman yang berhasil dikriopreservasi jumlahnya meningkat tajam selama 10 tahun terakhir. Prinsip metode penyimpanan ini adalah mereduksi proses

metabolisme melalui pengurangan media tumbuh atau dehidrasi sebagian jaringan yang dilakukan dalam nitrogen cair pada suhu -196°C. Metode ini sudah berhasil dikembangkan untuk penyimpanan embrio somatik kopi yang dapat ditumbuhkan kembali menjadi embrio sekunder atau melalui perkecambahan embrio secara langsung setelah dikulturkan pada media cair. Teknik kriopreservasi ini terbukti berhasil digunakan untuk konservasi plasma nutfah tanpa terjadinya penurunan viabilitas jaringan. Penyimpanan dengan pembekuan pada nitrogen cair merupakan metode yang potensial untuk penyimpanan dalam jangka panjang untuk konservasi plasma nutfah tumbuhan sebagaimana hasil penelitian Jaret tahun 1992⁶⁾.

Pengembangan teknik kriopreservasi di Indonesia memiliki prospek yang baik sebab penyelamatan keanekaragaman hayati perlu dukungan teknik konservasi yang aman dari gangguan perubahan iklim dan serangan jasad pengganggu tanaman. Teknik kriopreservasi ini sangat diperlukan untuk penyimpanan benih-

benih rekalsitran seperti kakao atau benih semi-rekalsitran atau yang diperbanyak secara vegetatif, seperti kopi dan kakao, berbagai jenis tanaman buah-buahan, umbi-umbian, tanaman hias, serta tanaman obat. Untuk itu perlu dukungan pengembangan infrastruktur yang memadai seperti kontinuitas suplai nitrogen cair serta peralatan pendukungnya, laboratorium kultur jaringan tanaman, dan pengembangan protokol sesuai komoditasnya.

Konservasi plasma nutfah kakao secara konvensional tidak mungkin dilakukan menggunakan benih atau pun entres sebab daya simpannya sangat terbatas. Benih kakao dapat disimpan selama 6 hari pada kondisi suhu 25–27°C, kadar air 18–20% dengan kelembaban 55–75%. Penyimpanan dalam jangka waktu lama menyebabkan daya kecambah dan vigor benih kakao menurun sebab kakao termasuk jenis benih rekalsitran. Kadar air yang tinggi menyebabkan benih kakao mudah terserang jamur. Melalui kriopreservasi maka bagian tanaman yang dapat disimpan, baik berupa embrio somatik atau pun jaringan hasil perbanyakan *in vitro* yang dilakukan pada suhu rendah (-196°C). Menurut Ashmore tahun 1997, selama proses kriopreservasi, pembelahan sel dan proses metabolisme sel atau jaringan dapat dihentikan selama periode penyimpanan yang dikehendaki¹⁾. 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 waktu yang relatif lama.

Tahap-tahap Kriopreservasi

Teknik penyimpanan didasarkan pada salah satu metabolisme reduksi (kehilangan media kultur, dehidrasi sebagian) atau penahanan metabolisme melalui kriopreservasi dalam nitrogen cair pada suhu -196°C. Metode ini sudah dilakukan pada embrio somatik kopi. Berbagai

macam keberhasilan telah dicapai seperti penumbuhan kembali embrio melalui embrio sekunder atau perubahan perkembangan tanaman melalui perkecambahan langsung embrio setelah proses penyimpanan.

1. Seleksi eksplan/bahan tanaman

Eksplan yang digunakan berasal dari jaringan tanaman yang sehat. Sel yang berukuran kecil, muda, mengandung banyak sitoplasma dan meristematik dapat bertahan lebih baik dibandingkan dengan sel yang besar dan mengandung banyak vakuola.

2. Pra-perlakuan

Perlakuan *pre-growth* dilakukan untuk melindungi jaringan tanaman terhadap nitrogen cair. Perlakuan *pre-growth* juga melibatkan penerapan zat aditif untuk meningkatkan toleransi tanaman terhadap stres, misalnya *abscisic acid*, *praline*, *trehalose*. Dehidrasi jaringan secara parsial dapat diperoleh melalui penerapan senyawa osmotik aktif.

3. Pemberian *cryoprotectant*

Cryoprotectant adalah zat yang digunakan untuk melindungi jaringan biologis dari kerusakan akibat pembekuan (kerusakan akibat pembentukan es). Bahan *cryoprotectant* yang umum digunakan diantaranya DMSO, *glyserol*, dll.

4. Penyimpanan

Penyimpanan atau pembekuan pada suhu yang tepat sangat berpengaruh pada bahan yang akan dibekukan. Pembekuan sel/jaringan berkisar pada suhu -70 hingga -196°C. Penyimpanan jangka panjang terbaik pada suhu -196°C.

5. Pencairan (*thawing*)

Cryotube yang berisi materi kultur/eksplan yang disimpan dengan kriopreservasi dikeluarkan dari dalam penyimpanan nitrogen cair, dan segera dimasukkan ke dalam *water bath* dengan suhu air ± 30–40°C.

6. Pemulihan (*recovery*)

Eksplan yang sudah dicairkan dalam *water bath* kemudian dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali untuk menghilangkan larutan *cryo-*

protectant. Selanjutnya, sebanyak 1 mL larutan eksplan yang sudah dicuci dikulturkan kembali ke dalam media untuk pertumbuhan, sesuai dengan media saat awal eksplan dikulturkan.

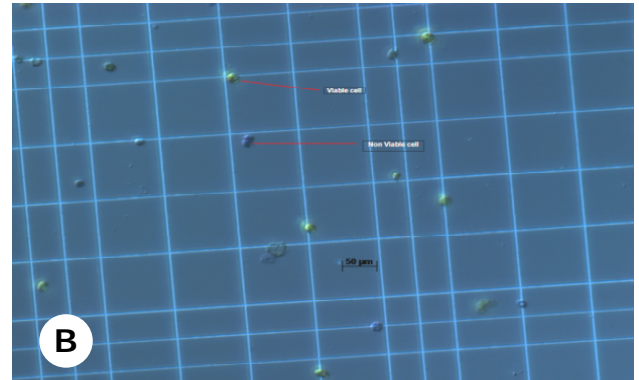
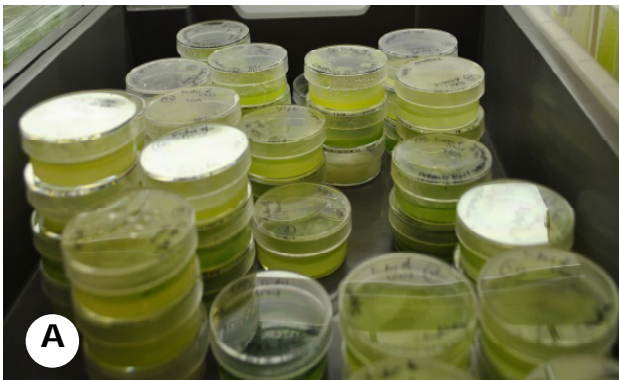
7. Penentuan viabilitas setelah kriopreservasi

Tanaman yang sudah disimpan dapat ditanam kembali untuk mengetahui daya hidupnya. Viabilitas sel dapat diuji menggunakan FDA, kemudian dihitung jumlah selnya, berat basah, dan berat kering. Pengujian lain juga dapat dilakukan menggunakan metode *plating*, elektroforesis protein, RFLP, dan analisis gen rRNA.

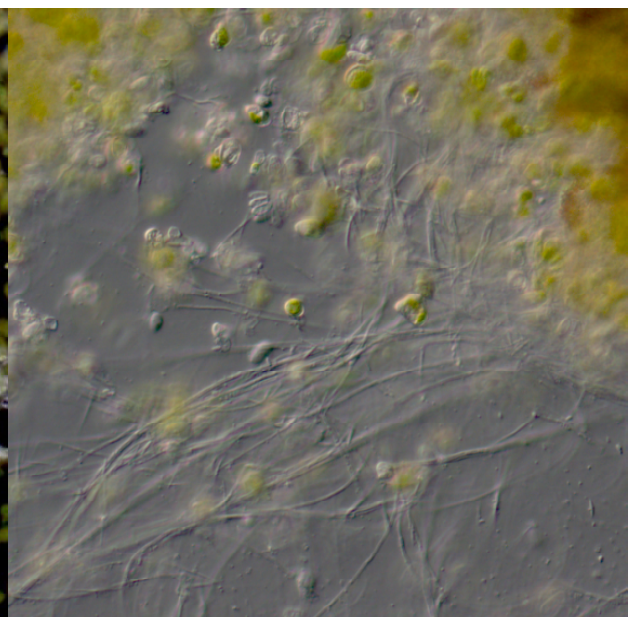
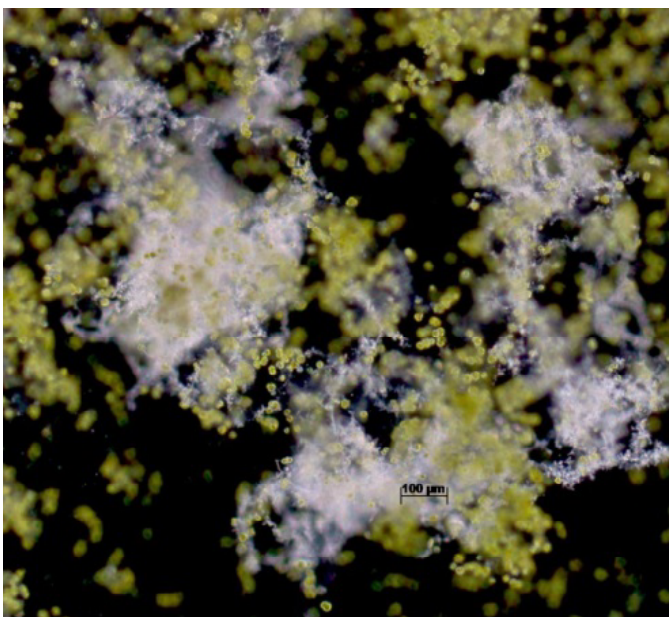
% viabilitas sel (FDA tes) =

$$\frac{\text{Jumlah sel yang berpendar}}{\text{Jumlah sel (viable + non-viable)}} \times 100$$

Selama proses kriopreservasi dalam nitrogen cair, peluang terjadinya kontaminasi jamur dan bakteri tidak dapat dihindari sehingga pemeliharaan kultur secara aseptik harus tetap dilakukan. Penerapan beberapa metode kriopreservasi sangat tergantung pada jenis dan kondisi eksplan. Dengan demikian penggunaan *cryoprotectant* perlu digunakan pada masing-masing metode untuk menghindari kerusakan sel. Paparan eksplan dalam *cryoprotectant* harus dilakukan dalam waktu yang tidak terlalu lama karena *cryoprotectant* dapat bersifat racun terhadap eksplan sehingga perlu diperhatikan waktu aplikasi dan konsentrasi *cryoprotectant* untuk setiap eksplan.



Pengujian viabilitas setelah kriopreservasi; A. Metode plating, B. Pengujian dengan menggunakan FDA



Kontaminasi jamur pada kultur yang disimpan dengan kriopreservasi

Metode Kriopreservasi

Teknik kriopreservasi mengacu pada penyimpanan suatu organisme hidup pada suhu yang sangat rendah, yang nantinya masih dapat disegarkan dan dipulihkan kembali seperti pada kondisi sebelum dilakukan penyimpanan. Hasil penelitian Grout tahun 1995, teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan bahan tanaman dalam suhu yang sangat rendah, yaitu -160°C hingga -180°C (nitrogen fase uap), bahkan sampai -196°C (nitrogen cair). Meskipun demikian, pembekuan pada suhu ekstra dingin dimungkinkan dapat menstabilisasi sel hidup selama seminggu bahkan bertahun-tahun, sehingga dibutuhkan nitrogen cair untuk penyimpanan dalam waktu yang lama. Cara yang paling efektif untuk meminimalisir potensi kematian adalah dengan menambahkan bahan *cryoprotection* pada kultur yang diprioritaskan untuk penyimpanan beku, dan untuk mengontrol proses tingkat pendinginan dan pemanasan selama pengawetan seperti yang dilaporkan Baust tahun 2002²⁾

Teknik kriopreservasi dapat dibedakan atas teknik lama (klasik) dan teknik baru:

1. Teknik lama (klasik)

Teknik ini didasarkan pada *freeze-induced dehydration*, yaitu dehidrasi yang diinduksi dengan pembekuan pada suhu di bawah titik beku air hingga -40°C . Teknik lama juga disebut teknik pembekuan lambat atau teknik pembekuan dua tahap. Menurut Ika & Ika tahun 2004, teknik pembekuan dua tahap meliputi inkubasi sel pada *cryoprotectant* 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 pelelehan (*thawing*)⁵⁾.

2. Teknik modern

Saat ini telah dikembangkan pembekuan embrio dengan metode vitrifikasi yang lebih mudah dilakukan dan sederhana. Pada metode vitrifikasi, material yang akan dibekukan ditempatkan dalam media hiper-osmolaritas atau *cryoprotectant* berkonsentrasi tinggi.

Setelah itu material langsung dicelupkan ke dalam nitrogen cair sehingga larutan yang beku ini seolah-olah menjadi seperti kaca.

Teknik ini didasarkan pada kejadian vitrifikasi, yaitu dehidrasi yang diinduksi pada suhu di atas titik beku air. Vitrifikasi adalah fase transisi air dari bentuk cair menjadi bentuk nonkristalin atau *amorf*, tembus pandang (*glassy*) karena elevasi ekstrim dari larutan yang viskos selama pendinginan. Teknik vitrifikasi didasarkan pada dehidrasi sel pada suhu *non-freezing* (tidak beku), yaitu dengan merendam bahan dalam larutan *cryoprotectant* dengan total konsentrasi 5–8 M pada suhu $0-25^{\circ}\text{C}$ dan diikuti oleh pembekuan dan selanjutnya pencairan. Adapun macam-macam teknik baru yang dikembangkan antara lain:

- 1. Vitrifikasi.** Pada teknik vitrifikasi, eksplan diperlakukan dengan *cryoprotectant* dan dehidrasi dengan larutan vitrifikasi, lalu diikuti dengan pembekuan cepat, pelelehan, dan pembuangan *cryoprotectant* serta pemulihan kultur.
- 2. Enkapsulasi dehidrasi.** Teknik enkapsulasi dehidrasi didasarkan pada teknologi yang telah dikembangkan pada produksi benih sintetik. Menurut Ika & Ika tahun 2004 pada teknik tersebut, bahan di-enkapsulasi pada kapsul alginat, lalu ditumbuhkan pada medium yang diperkaya dengan sukrosa dan dikeringkan secara parsial dalam *laminar air flow cabinet* atau silika gel hingga kandungan air sekitar 20% dan diikuti oleh pembekuan cepat⁵⁾.



Enkapsulasi eksplan menggunakan kalsium alginat

3. **Enkapsulasi-vitrifikasi.** Teknik enkapsulasi-vitrifikasi merupakan kombinasi antara teknik vitrifikasi dan enkapsulasi dehidrasi, yaitu eksplan dienkapsulasi dengan kapsul alginat, lalu dibekukan dengan teknik vitrifikasi.
4. **Desikasi.** Teknik desikasi merupakan teknik yang paling sederhana, yaitu mengeringkan bahan dalam *laminar air flow cabinet*, silika gel atau *flash drying* hingga kandungan air 10–20%, kemudian diikuti oleh pembekuan cepat.
5. **Pratumbuh.** Teknik pratumbuh meliputi penanaman bahan ke dalam media yang mengandung *cryoprotectant*, lalu diikuti oleh pembekuan cepat.
6. **Pratumbuh-desikasi.** Teknik pratumbuh-desikasi dilakukan dengan menanam bahan ke dalam media yang mengandung *cryoprotectant*, lalu mengeringkannya dalam *laminar air flow cabinet* atau gel silika dan diikuti oleh pembekuan cepat.
7. **Droplet-freezing.** *Droplet-freezing* diawali dengan pra-perlakuan bahan ke dalam media cair yang mengandung *cryoprotectant*, lalu meletakkan pada *Alluminium foil* yang disertai dengan droplet *cryoprotectant* dan diikuti oleh pembekuan cepat.

Teknik lama memerlukan peralatan terprogram yang cukup mahal harganya, sedangkan teknik baru tidak memerlukan peralatan canggih dan prosedurnya relatif lebih mudah. Selain itu, teknik lama memerlukan peralatan pembekuan, digunakan pada kultur sel, dan lebih sulit diaplikasikan pada unit sel yang lebih besar seperti tunas apikal atau embrio. 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. Hasil penelitian Ika & Ika tahun 2004 melaporkan bahwa teknik vitrifikasi 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)⁵.

Cryoinjury

Faktor-faktor yang menyebabkan terjadinya kerusakan sel akibat pembekuan pada awalnya

dikemukakan oleh Mazur tahun 1972, yang menunjukkan laju perubahan suhu di mana sel-sel yang mengalami pembekuan merupakan faktor penting karena mengendalikan perpindahan air melalui membran sel dan menentukan konsentrasi zat terlarut di dalam sel. Kerusakan karena pengkristalan es merupakan faktor penting pada *cryoinjury* alga dan perubahan pergerakan air dan kondisi air (sebagai padat/ es atau cairan) selama pembekuan mempengaruhi kelangsungan hidup setelah penyimpanan. Penambahan *cryoprotectant* berfungsi untuk mengurangi suhu selama pembekuan, karena *cryoprotectant* dapat masuk dan melindungi sel dari kerusakan. Selain itu, dengan penambahan *cryoprotectant* dapat memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi. *Cryoprotectant* yang umum digunakan adalah DMSO, gliserol, PEG, sorbitol, dan manitol. Senyawa dalam *cryoprotectant* dapat dipisah menjadi dua, yaitu senyawa yang dapat masuk ke dalam sel (*permeating agent*) seperti DMSO, *glyserol* (pada suhu tertentu) dan yang tidak dapat masuk ke dalam sel (*non-permeating agent*) seperti sukrosa dan gula alkohol (manitol, sorbitol). Beberapa karakteristik dari *cryoprotectant* yang baik adalah tidak bereaksi dengan eksplan, tidak beracun, tidak mudah terbakar⁴.

Selama pembekuan dan pencairan, sel dapat mengalami kerusakan sebagai akibat dari (1) paparan bahan pada suhu rendah, (2) pembentukan kristal es, (3) dehidrasi sel, dan (4) terbentuknya radikal bebas. Paparan pada suhu rendah dapat menyebabkan inaktivasi protein yang sensitif terhadap suhu dingin. Sebagian besar pembentukan es intraseluler bersifat letal dan pada dasarnya sel dapat mentolerir terbentuknya es ekstraseluler. Namun demikian, pembentukan es ekstraseluler juga dapat merusak sel karena daya mekanis dari kristal es yang tumbuh, gaya adesi kristal es terhadap membran, interaksi elektrik yang disebabkan oleh perbedaan kelarutan ion pada fase es dan cair, terbentuknya gelembung udara intraseluler, kerusakan kimia yang berhubungan dengan peroksidase lipid serta perubahan pH pada lokasi tertentu seperti yang dilaporkan Ika & Ika tahun 2004⁵.

Penutup

Kriopreservasi dimanfaatkan untuk mengatasi beberapa kendala dalam penyimpanan *in vitro* dan konservasi plasma nutfah tanpa terjadinya penurunan viabilitas. Hingga saat ini, telah banyak spesies tanaman yang dapat disimpan melalui teknik kriopreservasi, mulai dari penyimpanan dalam bentuk *shoot tip*, benih, embrio somatik, dan juga suspensi kalus. Di samping dapat dimanfaatkan untuk konservasi plasma nutfah, teknologi kriopreservasi ini dapat digunakan dalam proses regenerasi tanaman tanpa harus melalui induksi eksplan. Salah satu kunci sukses untuk melakukan kriopreservasi adalah melalui optimasi larutan *cryoprotectant* untuk menghindari terjadinya kerusakan membran/sel (*cryoinjury*). Untuk menjaga kualitas eksplan yang disimpan dapat dilakukan pengujian kestabilan genetik maupun fenotipik sehingga dapat mendeteksi adanya penyimpangan akibat kriopreservasi. Faktor penting lain yang perlu dipertimbangkan dalam penerapan teknologi kriopreservasi, antara lain: fasilitas penyimpanan, jaminan keamanan,

dan pendokumentasian eksplan yang disimpan (manajemen database). Manajemen database sendiri mencakup sumber kultur, data suhu, *cryptotectant*, laju pembekuan, kondisi kultur, media, dan viabilitas.

Sumber Pustaka

- ¹Ashmore, S.E. (1997). *Status report on the development and application of in vitro technique to the conservation and use of plant genetic resources*, 67. IPGRI, Queensland, Australia.
- ²Baust, J.M. (2002). Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preservation Technology*, 1, 17–31.
- ³Grout, B.W.W. (1995). Introduction to the *In Vitro* Preservation of Plant Cells, Tissues and Organs. In: B Grout (Ed.). *Genetic Preservation of Plant Cells In Vitro*, 1–17.
- ⁴Mazur, P.; S.P. Leibo & E.H.R. Chu (1972). A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp. Cell Res.*, 71, 345–355.
- ⁵Roostika, I. & I. Mariska (2004). Pemanfaatan teknik kriopreservasi dalam penyimpanan plasma nutfah tanaman. *Buletin Plasma Nutfah*, 9, 10–18.
- ⁶Towill, L.E. & R.L. Jarret (1992). Cryopreservation of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lan) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Report*, 11, 175–178.

0



Vicco *The Premium Chocolate*

Coklat yang menyehatkan, lezat,
dan menyenangkan untuk dinikmati.

Tersedia
10 varian rasa:
durian, jeruk, apel, mangga,
strawberry, nangka, alpukat, melon,
anggur, dan jambu merah