

# KONSERVASI PLASMA NUTFAH SECARA IN VITRO

Oleh Donowati S. Tjokrokusumo

Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri

## Abstrak

*Teknik-teknik in vitro mempunyai potensi yang sangat besar untuk koleksi, pertukaran, dan konservasi termasuk (1) sumberdaya genetik dari benih-benih yang mengandung "recalcitrant" dan species yang di perbanyak secara vegetatif seperti halnya species yang sedang dalam bahaya kepunahan, (2) genotipe "elite" yang dikembangkan-biakkan pada skala besar dalam laboratorium produksi, dan (3) kultur /pembibitan galur sel yang memproduksi bahan "metabolite" dan bahan baku yang direkayasa secara genetik. Teknik koleksi secara in vitro yang menggunakan embrio atau jaringan vegetatif telah diterapkan dilapangan untuk mengkoleksi plasma nutfah dari berbagai macam species yang bermasalah. Kultur in vitro secara rutin digunakan untuk pertukaran sumber genetik dari sejumlah species, karena keuntungannya dengan teknik ini dalam hal status phytosanitary dan biaya nya relatif kecil.*

*Teknik pertumbuhan lambat telah dikembangkan untuk konservasi jangka menengah pada sejumlah species tetapi penggunaan secara rutin masih terbatas pada sejumlah species tanaman tertentu. Penggunaan teknik cryopreservasi secara rutin masih terbatas pada konservasi galur sel dalam skala penelitian laboratorium. Namun demikian, petunjuk sederhana dan teknik pembekuan yang efisien telah dikembangkan baru-baru ini untuk "apices" dan embrio, secara operasional untuk peningkatan jumlah species dapat dipertimbangkan. Dalam paper ini akan dibahas tentang (1) pengembangan teknik koleksi in vitro, (2) demonstrasi dari fleksibilitas, kesederhanaan dan kepraktisan penyimpanan pada pertumbuhan lambat guna peningkatan kegunaannya, (3) percobaan teknik cryopreservasi yang telah ada pada suatu skala besar dalam suatu konteks gene bank dan pengembangan dari protocol teknik cryopreservasi.*

**Keywords** : konservasi sumberdaya genetik, pembibitan secara *in vitro*, pengkoleksian secara *in vitro*, pertumbuhan lambat, *kryopreservasi*.

## 1. PENDAHULUAN

Kebanyakan spesies memproduksi benih dengan cara dikeringkan hingga kandungan kadar airnya serendah mungkin dan disimpan untuk jangka waktu yang panjang pada temperatur yang rendah. Namun, sejumlah spesies di daerah tropika (tropis) atau subtropika kebanyakan merupakan jenis pohon atau pepohonan dan species semak belukar yang memproduksi bahan yang bersifat rekalsitran (recalcitrant) atau benih-benih yang mana tidak mampu untuk bertahan dalam keadaan sangat kering dan kerap kali rentan terhadap kondisi yang sangat dingin dan karenanya tidak dapat disimpan pada keadaan kering pada temperatur rendah (Roberts, 1973; Ellis dkk, 1990). Beberapa species tanaman pangan tidak dapat memproduksi benih atau mempunyai sifat genotipe yang steril. Spesies lainnya yang memproduksi benih dengan cara klasik namun mempunyai sifat heterozygot yang tinggi, dan oleh karenanya spesies-spesies tersebut dipropagasi secara vegetatif.

Metode tradisional untuk konservasi sumberdaya genetik pada spesies-spesies yang bermasalah tersebut dilapangan adalah sluruh tanaman utuh. Karena itu ada beberapa

masalah serius dengan gen bank lapangan, termasuk diantaranya bahaya terhadap bencana alam, dan serangan hama penyakit (Withers and engels, 1990). Lebih lanjut, distribusi plasma nutfah dan pertukaran gen bank dilapangan sangat sulit dikarenakan perkembangbiakannya secara vegetatif alami dari bahan baku tersebut mempunyai resiko besar karena factor adanya perpindahan penyakit (disease transfer).

Konservasi spesies langka dan spesies dalam bahaya merupakan suatu isu yang mendapat perhatian belakangan ini (Fay, 1994). Pengembangan bioteknologi telah mengarah ke produksi plasma nutfah termasuk klon yang diperoleh dari genotipe "elite" yang merupakan galur sel dengan atribut khusus dan secara genetik mempunyai bahan yang tertransformasi (Engelmann, 1994).

Teknik pembibitan secara *in vitro* telah digunakan secara luas untuk perbanyak tanaman semenjak protocol mikropropagasi dipublikasikan untuk lebih dari 1500 jenis species tanaman yang dipropagasi secara teknik *in-vitro* (George, 1993-1996). Teknik kultur jaringan mempunyai potensi yang sangat besar untuk koleksi, pertukaran, dan konservasi plasma nutfah tanaman (Engelmann, 1991). Sistem kultur jaringan memungkinkan propagasi

tanaman diperoleh secara cepat dalam lingkungan yang aseptik (bebas kuman). Tanaman yang bebas virus dapat diperoleh melalui kultur jaringan meristematis dan termoterapis. Oleh karena itu produksi stok bibit yang bebas penyakit dapat diperoleh dengan teknik ini, kerennanya prosedur karantina untuk pertukaran plasma nutfah (germ) secara internasional menjadi lebih sederhana. Miniaturisasi eksplan memungkinkan pengurangan kebutuhan ruang sehingga biaya tenaga kerja untuk perawatan serta pengumpulan plasma nutfah (germ) jauh lebih murah.

### 1.1. Kultur *In Vitro* untuk Koleksi dan Pertukaran Plasma Nutfah

Pendayagunaan tehnik kultur *in vitro* mempunyai daya tarik khusus untuk koleksi plasma nutfah dari benih species yang mengandung sifat "recalcitrant". Sejumlah benih yang bersifat "recalcitrant" mempunyai viabilitas yang sangat pendek (kurang dari seminggu untuk beberapa jenis spesies seperti *Dipterocarpaceae*) dan kerap kali mempunyai berat dan bersisi besar seperti dalam kasus pohon kelapa. Koleksi secara *in vitro* digunakan secara sukses dalam percobaan dari berbagai jenis species termasuk diantaranya kelapa, coklat, pisang, kopi, dan berbagai macam tanaman makanan ternak dan tanaman buah-buahan. Koleksi plasma nutfah pohon kelapa adalah salah satu contoh yang paling baik dari aplikasi tehnik kultur *in vitro*. Teknik ini memungkinkan pertukaran plasma nutfah melalui ekstraksi embrio dari biji pada saat koleksi dilapangan (Assy-Bach dkk, 1987; Sossou dkk, 1987).

Pertukaran plasma nutfah internasional dalam bentuk kultur *in vitro* untuk berbagai macam jenis tanaman pangan seperti kentang, ubi kayu, yam, dan pisang-pisangan secara rutin telah dilakukan. Miniaturisasi eksplan bias menghemat biaya pengiriman dan memungkinkan pertukaran material bebas virus dalam kondisi steril sehingga prosedur karantina menjadi lebih sederhana dibandingkan dengan metode *in vivo* (Fay, 1994).

### 1.2. Kultur *In Vitro* untuk Konservasi Plasma Nutfah

Metode yang dipergunakan dalam konservasi plasmanutfah beragam menurut lamanya penyimpanan yang diinginkan (Engelmann, 1991). Konservasi jangka menengah, bertujuan untuk mengurangi kecepatan pertumbuhan sehingga interval /selang antara sub-kultur dapat ditingkatkan.

Untuk konservasi jangka panjang, metode satu-satunya yang saat ini sudah tersedia adalah kryopreservasi yaitu penyimpanan pada temperatur ultra rendah, biasanya dalam nitrogen cair (-196°C). Dengan teknik ini proses metabolisme seperti halnya pembelahan sel terhenti pada temperatur ini. Karena itu tanaman dapat dikonservasi tanpa modifikasi untuk periode yang lama dalam volume yang kecil dengan sedikit perawatan.

## 2. KONSERVASI JANGKA MENENGAH

Kultur standard hanya dapat digunakan untuk penyimpanan jangka menengah bagi species yang punya pertumbuhan lambat, misalnya seperti tanaman kopi. Plantlets *in vitro* dari tanaman kopi dapat di rawat dalam medium standar pada temperature 27°C tanpa subkultur selama 6-12 bulan, tergantung pada speciesnya (Bertrand-Desbrunais, 1991). Walaupun demikian dalam kebanyakan kasus kondisi lingkungan dan /atau media kultur harus dimodifikasi untuk mengurangi percepatan pertumbuhan. Hal ini sering sekali diperoleh melalui tehnik penurunan temperature, dan kerap kali dibarengi dengan pengurangan intensitas sinar atau bahkan penekanan secara menyeluruh. Plantlets *in vitro* tanaman strawberry dapat disimpan pada temperatur 4 °C dalam kamar gelap selama 6 tahun dengan penambahan beberapa tetes media nutrisi secara reguler (Mullin dan Schlegel, 1976).

Species yang bertoleransi terhadap dingin dikerjakan pada temperature dalam kisaran 0-5 °C tetapi temperatur yang lebih tinggi dibutuhkan pada kasus species tropika yang pada umumnya sensitive terhadap udara dingin. Plantlets *in vitro* Cassava harus disimpan pada temperatur diatas 20 °C (Roca, dkk, 1984). Embryo somatic tanaman kelapa sawit dan plantlets *in vitro* tidak tahan hidup dalam kondisi transisi temperature dibawah 18 °C (Corbineau dkk, 1990). Sebaliknya, plantlets *in vitro* tanaman pisang dapat disimpan pada temperatur 15 °C selama 15 bulan (Banerjee dan de Langhe, 1985). Hal yang juga memungkinkan dalam membatasi pertumbuhan yaitu dengan cara mengurangi kadar gula dan/atau konsentrasi mineral pada kultur medium. Hal lain yang berpengaruh terhadap kehidupan suatu kultur adalah tipe dan volume wadahnya. Sebagai catatan penting bahwa dalam menggunakan wadah pilih tutup yang cukup ketat untuk membatasi penguapnya media kultur (Florent, 1998).

Studi baru-baru ini pada *in vitro* plantlets tanaman kopi menunjukkan bahwa tidak semua species mampu hidup setelah penyimpanan dalam kondisi pertumbuhan yang diperlambat

pada media kultur tunggal (Dussert dkk, 1997). Beberapa media mungkin harus dimodifikasi untuk mengakomodasikan kebutuhan yang berbeda-beda dari setiap material yang dikonservasi dalam "pertumbuhan lambat".

Media baru dalam teknik konservasi baru-baru ini sedang dalam penyelidikan. Mereka mengurangi tingkat ketersediaan oksigen dalam kultur (dengan menutupi eksplant dengan sebuah lapisan media cair atau minyak mineral atau dengan menempatkan dalam udara terkontrol), pengeringan (desikasi) dan pengkapsulan eksplant dalam butir-butir alginat (Engelmann, 1997). Namun demikian tehnik ini masih dalam taraf percobaan.

### 3. KONSERVASI JANGKA PANJANG

Kebanyakan sistem-sistem percobaan yang diterapkan dalam kryopreservasi (suspensi sel, kalus, ujung tunas, somatic dan embryo zygote) mempunyai kandungan selular air yang tinggi dan karena itu sangat sensitive terhadap terjadinya pembekuan luka karena sebagian besar tidak toleransi terhadap pembekuan. Sel-sel yang mempunyai sifat demikian harus dihidrasi secara buatan untuk mencegah mereka dari kerusakan yang disebabkan oleh kristalisasi air diantara sel sehingga menjadi berbentuk es (Mazur, 1984). Tehnik yang diterapkan serta mekanisme fisik dalam tehnik kryopreservasi klasik dan baru berbeda (Withers dan Engelmann, 1997). Tehnik kryopreservasi klasik menggunakan pembekuan yang menghasilkan dehidrasi, sedangkan tehnik kryopreservasi baru didasarkan pada vitrifikasi (kamus Wojowasito dkk; pelapisan seperti kaca). Vitrifikasi didefinisikan sebagai transisi air langsung dari fase cair kedalam suatu fase amorphous atau kaca/gelas untuk menghindari terbentuknya kristal es (Fahy dkk, 1984).

#### 3.1. Tehnik Kryopreservasi Klasik

Tehnik kryopreservasi klasik telah dikembangkan pada tahun 70-80an. Teknik ini meliputi suatu perlakuan kryoprotektif diikuti dengan pembekuan secara perlahan yang dikerjakan dengan menggunakan suatu peralatan dapat di program untuk pembekuan (Kantha, 1985). Pada umumnya mempergunakan bahan-bahan kryoprotektif seperti DMSO (dimethylsulfoxite), mannitol, sorbitol, sucrose dan PEG (polyethyleneglycol). Bahan-bahan kryoprotektif mempunyai prinsip aksi osmotik tetapi beberapa dari mereka seperti DMSO bisa masuk ke sel dan mencegah integritas selular selama pembekuan. Untuk kebanyakan material, kondisi pembekuan yang optimal terdiri dari suatu kecepatan pendinginan

yang lambat (0.5 s/d 2 °C/min) turun ke sekitar – 40 °C diikuti oleh perendaman yang cepat dari contoh dalam cairan nitrogen. Prosedur kryopreservasi klasik hanya cocok untuk pembekuan kultur yang tidak terdeferensiasi seperti halnya suspensi sel dan kalus (Withers, 1985); Kartha dan Engelmann, 1994).

#### 3.2. Tehnik Kryopreservasi Baru

Untuk pembekuan jaringan dan organ yang terdeferensiasi seperti apices, embryo zygotic dan somatic, tehnik baru berdasarkan pada dehidrasi sebagian dari eksplant diikuti dengan pembekuan yang cepat telah dikembangkan selama bertahun-tahun belakangan ini (Whiters dan Engelmann, 1997) Prosedur berdasarkan verifikasi secara operasional kurang kompleks dibandingkan dengan yang klasik karena mereka tidak membutuhkan penggunaan pembekuan yang terprogram. Sebagai tambahan karena pembentukan es dihindari selama proses pembekuan, mereka teradaptasi untuk pembekuan organ yang kompleks seperti halnya species atau embryo yang berisi variasi tipe sel, setiap sel membutuhkan suatu keunikan dibawah kondisi pembekuan yang menghasilkan dehidrasi (Whiters dan Engelmann, 1997). Akhirnya teknologi konservasi secara in vitro mempunyai potensi yang lebih besar untuk penggunaan yang lebih luas dari pada tehnik klasik hanya memerlukan sedikit modifikasi untuk berbagai tipe sel.

### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

Perkembangan pesat telah dicapai pada decade yang lalu dalam pengembangan teknik in vitro untuk konservasi sumber genetic tanaman. Telah banyak kasus beberapa tanaman yang dikoleksi secara in vitro , pertumbuhan lambat dan cyopreservation dapat digunakan untuk meningkatkan konservasi sumber genetic tanaman. Namun, disamping potensinya , tehnik in vitro masih terbatas digunakan. Hal ini melihat fakta bahwa masih sangat sedikit diketahui dalam komunitas sumber genetic untuk itu penelitian lebih lanjut masih diperlukan .

#### DAFTAR PUSTAKA

1. 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.

2. Assy-Bah, B. and Engelmann, F. (1992). Cryopreservation of mature embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) and subsequent regeneration of plantlets. *Cryo-Letters* 13:117-126.
3. Assy-Bah, B., Durand-Gasselin, T. and Pannetier, C. (1987). Use of zygotic embryo culture to collect germplasms of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Gen. Res. Newsl.* 71:4-10.
4. Bajaj, Y.P.S. (1995). Cryopreservation of Plant Germplasm I: Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 32, Springer Verlag, Berlin.
5. Banerjee, N. and De Langle, E. (1985). A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Rep.* 4:351-354.
6. Bertrand-Desbrunais, A. (1991). La conservation des ressources genetiques des cafeiers. PhD Thesis, University Paris 6.
7. Corbineau, F., Engelmann, F. and Come, D. (1990). Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Plant Sci.* 71:29-34.
8. Dumet, D., Engelmann, F., Chabrillange, N., and Duval, Y. (1993). Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Rep.* 12:352-355.
9. Dumet, D. (1994). Cryoconservation des massifs d'embryons somatiques de palmier a huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par deshydratation-vitrification. Etude du role du role du saccharose pendant le pretraitement. PhD Thesis, University Paris 6, France.
10. Dussert S., Chabrillange, N. Anthony F., Engelmann, F., Recalt, C. and Hamon, S. (1997). Variability in storage response within a coffee (*Coffea* spp.) core collection under slow growth conditions. *Plant Cell Rep.* 16:344-348.
11. Ellis, R.E., Hong, T., and Roberts, E.H. (1990). An intermediate category of seed storage behavior? I. Coffee. *J. Exp. Bot.* 41:1167-1174.
12. Engelmann, F. (1991). In vitro conservation of tropical germplasm – review. *Euphytica* 57:227-243.
13. Engelmann, F. (1992). Cryopreservation of embryos. In *Reproductive Biology and Plant Breeding*, (Y. Dattee, C. Dumas, and A. Gallais, eds.). Springer Verlag, Berlin, pp.281-290.
14. Engelmann, F. (1994). Cryopreservation for the long-term conservation of tropical crops of commercial importance. In *Proc. Intl. Symp. on the Application of Plant In vitro Technology*, Univ. Pertanian Malaysia, Selangor, 16-18 Nov. 1993, pp. 64-77.
15. Engelmann, F. (1997). In vitro conservation methods. In *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*, (J.A. Callow, B.V. Ford-Lloyd and J.H. Newbury, eds.). CAB International, Wellingford, pp.119-161.
16. Engelmann, F., Dumet, D., Chabrillange, N., Abdelnour-Esquivel, N., Assy-Bah, B., Dereudre, J. and Duval, Y. (1995). Factors affecting the cryopreservation of coffee, coconut, and oil palm embryos. *Plant Gen. Newsl.* 103:27-31.
17. Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., and Merymann, H.T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
18. Fay, M.F. (1994). In what situations is in vitro culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation* 3:176-183.
19. George, E.F. (1993-1996). *Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2-In Practice. 2<sup>nd</sup> Edition.* Exegetics, Edington, UK.
20. Kartha, K.K. (1985). *Cryopreservation of Plant Cells and Organs.* CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
21. Kartha, K.K., and Engelmann, F. (1994). Cryopreservation and germplasm storage. In *Plant Cell and Tissue Culture*. (I.K. Vasil and T.A. Thorpe, eds.). Kluwer, Dordrecht, pp.195-230.
22. Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and applications. *Am. J. Physiol.* 247:C125-142.
23. Mullin, R.H. and Schlegel, D.E. (1976). Cold storage maintenance of strawberry meristem plantlets. *HortSci.* 11:100-101.
24. Panis, B. (1995). Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. *Dessertationes de Agricultural, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.*
25. Park, Y.S., Pond, S.E., and Bonga, J.M. (1994). Somatic embryogenesis in white spruce (*Picea glauca*): Genetic control in somatic embryos to storage, maturation treatments, germination, and cryopreservation. *Theor. Appl. Genet.* 89:742-750.
26. Roca, W.M., Reyes, R., and Beltran, J. (1984). Effect of various factors on minimal growth in tissue culture storage of cassava germplasm. In *Proc. Sixth Symp. of the Intl. Soc. for Tropical Root Crops*, 21-26 Feb. 1994, Lima, Peru, pp.441-446.
27. Roberts, E.H. (1973). Predicting the viability of seeds. *Seed Sci. Technol.* 1:499-514.