

Metode Perlakuan Pendahuluan untuk Penyimpanan Benih Melur pada Suhu Sangat Rendah *Pretreatment Method of Melur Seeds Storing at Extreme Low Temperature*

Dida Syamsuwida^{1*} dan Aam Aminah¹
¹Balai Penelitian Teknologi Perbenihan Bogor

Abstract

*Cryopreservation is a method of long term storage in which an extremely low temperature of nitrogen liquid (-196°C) being used to preserve seeds of recalcitrant characteristics. The study was aimed to determine the standard protocol of vitrification in melur (*Podocarpus neriifolius*) seeds storing in various cryoprotectants. The use of sucrose PVS2 and DMSO as a cryoprotectant were employed to protect the regularly-desiccated seeds during preserving in liquid nitrogen for 1 hour. Evaluation was made on the viability by germinating the seeds in green house. Randomized completely design of 3 factors was used in this study. The results revealed that seed moisture content was 53% after being desiccated using vacuum-desicator for 24 hours and showed more than 85% of germination, in average. Vitrificated seeds in DMSO for 2 hours performed 66.67% germination. Meanwhile, seeds in sucrose and PVS2 for 1 hour reached of 53.33% and 25.33% of germination, respectively. Preservation in liquid nitrogen for 1 hour did not succeed to keep any treated seeds as there was no germination found during viability testing.*

Keywords: cryopreservation, vitrification, melur, desiccation, recalcitrant

*Penulis untuk korespondensi, e-mail: dida_syam@yahoo.co.id

Pendahuluan

Kriopreservasi adalah salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengonservasi sumberdaya genetik terutama terhadap tanaman yang mempunyai karakteristik benih rekalsitran (Berjak dkk. 1998). Melalui metode ini material tanaman dapat diawetkan tanpa mengubah morfologi maupun kandungan biokimianya, sehingga dapat juga digunakan untuk pelestarian jenis-jenis tanaman langka dan hampir punah. Metode ini sudah berkembang dengan baik dan menjadi metode rutin untuk beberapa jenis tanaman. Ketahanan terhadap kondisi dingin beku (*freezing*) di dalam larutan nitrogen telah banyak diteliti pada lebih dari 100 jenis tanaman baik yang berasal dari daerah beriklim sedang maupun tropik pada berbagai kultur jaringan tanaman (Engelmann 1997 dalam Chaudhury dan Malik 1998). Namun demikian, belum ada metode dengan tujuan yang sama untuk struktur tanaman yang lebih kompleks seperti apeks dan embrio, sehingga masih perlu dilakukan penelitian mendalam untuk mendapatkan metode yang baku dan dapat diaplikasikan secara lebih luas.

Dalam prosedur vitrifikasi, bahan tanaman harus cukup terdehidrasi secara osmotik pada suhu tidak dingin dengan memberi konsentrasi larutan vitrifikasi yang tinggi untuk menghindari kristalisasi saat dimasukkan ke dalam larutan nitrogen. Ketidakmampuan benih rekalsitran untuk menoleransi

pengeringan hingga kadar air optimum yang dapat disimpan pada suhu di bawah -5°C memerlukan percobaan yang lebih intensif. Dengan demikian perlu dilakukan percobaan pendahuluan untuk mengetahui kadar air optimum yang menghasilkan daya berkecambah paling baik serta mengandung kadar air kritis dimana benih atau embrio masih mampu berkecambah.

Penggunaan embrio zigotik atau embrio aksis banyak ditujukan untuk menyelamatkan materi hasil persilangan, studi transformasi dan konservasi sumberdaya genetik. Dalam sepuluh tahun terakhir, struktur embrio banyak digunakan dalam penyimpanan kriogenik khususnya untuk jenis benih rekalsitran dan subortodok (Engelmann 1992; Hong dan Ellis 1996).

Dalam penelitian ini penyimpanan benih utuh dan embrio jenis melur (*Podocarpus neriifolius*) dilakukan pada suhu ekstrim rendah (-196°C) dengan metoda vitrifikasi. Melur adalah jenis tanaman hutan yang memiliki benih bersifat rekalsitran (Tompsett 1992; Syamsuwida dkk. 2004).

Penelitian ini ditujukan untuk memperoleh prosedur preservasi optimum dengan metode vitrifikasi pada suhu rendah terhadap benih melur.

Metodologi

Pengumpulan buah dilakukan di daerah Gunung Kidul, Jawa Tengah. Penelitian dilakukan di

laboratorium dan rumah kaca Balai Penelitian Teknologi Perbenihan (BPTP) Bogor. Bahan tanaman yang digunakan adalah benih melur dalam bentuk benih utuh dan embrio (tanpa kotiledon).

Bahan kimia yang digunakan adalah nitrogen cair, sukrosa, dimethyl sulfoksid (DMSO), gliserol, ethilen glikol, dan *silica gel*. Peralatan yang digunakan adalah tabung nitrogen cair, *vacuum desicator*, timbangan analitis, *germinator chamber*, gelas ukur, cawan petri, *beaker glass*, botol penyimpanan bahan tanaman (*vials*).

Metode yang dilakukan terdiri dari metode penurunan kadar air dan metode kriopreservasi dengan penjelasan sebagai berikut:

Metode penurunan kadar air. Untuk mendapatkan kadar air benih yang diinginkan digunakan teknik penurunan kadar air dengan alat desikator (divakum dan diisi *silica gel*) dan inkubator suhu 35°C. Teknik ini dilakukan agar penurunan kadar air benih tidak terlalu drastis. Sebelum dilakukan teknik penurunan kadar air tersebut, dilakukan percobaan pendahuluan. Benih yang digunakan adalah benih berwarna coklat dan hijau. Lama pengeringan adalah 24 jam dengan interval waktu setiap 3 jam. Kadar air awal benih coklat adalah 33,69% dan benih hijau adalah 56,07%. Adapun perlakuan penurunan kadar air pada percobaan pendahuluan terdiri dari:

- a Alat pengeringan : A1 = inkubator (35°C),
A2 = *vacuum desicator*
- b Warna benih : B1 = kulit benih coklat,
B2 = kulit benih hijau
- c Lama pengeringan : C1 = 3 jam,
C2 = 6 jam,
C3 = 12 jam,
C4 = 18 jam, dan
C5 = 24 jam

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap pola faktorial dengan 3 faktor dan ulangan 3 kali. Setiap unit percobaan terdiri dari 50 benih. Model persamaannya adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + C_k + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{\ell(ijk)}$$

dimana:

- Y_{ijkl} = peubah respon karena pengaruh bersama taraf ke-*i* faktor A, taraf ke-*j* faktor B dan taraf ke-*k* faktor C yang terdapat pada observasi ke-*l*
- μ = efek rata-rata yang sebenarnya (berharga konstan)
- A_i = efek sebenarnya dari taraf ke-*i* faktor A
- B_j = efek sebenarnya dari taraf ke-*j* faktor B
- AB_{ij} = efek sebenarnya dari interaksi antara taraf ke-*i* faktor A dengan taraf ke-*j* faktor B
- C_k = efek sebenarnya dari taraf ke-*k* faktor C
- AC_{ik} = efek sebenarnya dari interaksi antara taraf ke-*i* faktor A dengan taraf ke-*k* faktor C
- BC_{jk} = efek sebenarnya dari interaksi antara taraf ke-*j* faktor B dengan taraf ke-*k* faktor C

ABC_{ijk} = efek sebenarnya terhadap peubah respon yang disebabkan oleh interaksi antara taraf ke-*i* faktor A, taraf ke-*j* faktor B dan taraf ke-*k* faktor C

$E_{\ell(ijk)}$ = efek sebenarnya dari unit eksperimen ke-*l* disebabkan oleh kombinasi perlakuan (*ijk*)

Metode kriopreservasi. Perlakuan kriopreservasi untuk benih melur disajikan pada Tabel 1. Tahapan-tahapan dalam pelaksanaan protokol preservasi kriogenik dapat diuraikan sebagai berikut:

- a Vitriifikasi, yaitu proses perlindungan terhadap sel-sel tanaman dari kerusakan selama berada dalam nitrogen cair. Krioprotektan yang digunakan terdiri dari sukrosa (Yap dkk. 1999), PVS2 (Sakai dkk. 1990), dan DMSO (Sudarmonowati dkk. 1995).
- b Pembekuan, yaitu proses pencelupan benih ke dalam tabung berisi nitrogen cair (-196°C) selama 1 jam untuk mengetahui tingkat kemampuan benih yang disimpan pada suhu ekstra rendah.
- c *Thawing* (pencairan), yaitu proses pencairan bahan tanaman setelah disimpan dalam nitrogen cair dengan cara perendaman pada larutan sukrosa 0,4 M pada suhu kamar selama 1 jam dan pembilasan menggunakan akuades hingga bersih.
- d Pengujian daya berkecambah, yaitu pengujian pada embrio (tanpa kotiledon) melalui metode uji di Atas Kertas (UDK) dalam *germinator chamber* 25°C dan pengujian pada benih utuh di rumah kaca (30°-34°C) menggunakan media pasir halus.

Pengamatan yang dilakukan terhadap setiap unit percobaan meliputi daya berkecambah dan kecepatan berkecambah. Selanjutnya, hasil pengamatan dianalisis secara statistik melalui pengujian perlakuan percobaan menggunakan uji Duncan.

Hasil dan Pembahasan

Penurunan kadar air. Teknik pengeringan baik dengan menggunakan inkubator 35°C maupun *vacuum desicator* menunjukkan nilai kadar air benih yang tidak jauh berbeda yaitu berkisar antara 32%-35% untuk benih yang berwarna coklat dan antara 51%-53% untuk benih yang berwarna hijau. Hasil pengamatan selengkapnya disajikan pada Tabel 2.

Penurunan kadar air secara bertahap yang diharapkan terjadi selama pengeringan setiap 3 jam sekali tampaknya kurang berhasil. Namun demikian, setelah pengeringan selama 24 jam terjadi penurunan kadar air menjadi 32,80% untuk benih yang berwarna coklat dan dikeringkan dalam inkubator. Penurunan kadar air pada benih yang berwarna hijau, baik yang dikeringkan dalam inkubator maupun desikator, berkisar antara 51-52%.

Hasil pengamatan kadar air benih melur sehubungan dengan perlakuan yang diberikan dapat dilihat pada Tabel 2. Benih melur kontrol yang berwarna hijau memiliki daya berkecambah yang lebih

tinggi daripada yang berwarna coklat. Setelah dilakukan penurunan kadar air dengan pengeringan (baik menggunakan inkubator maupun desikator), benih yang berwarna coklat tidak mampu lagi berkecambah hingga akhir pengamatan. Sebaliknya, benih berwarna hijau menghasilkan daya berkecambah yang tinggi (>85%) setelah dilakukan pengeringan hingga 24 jam.

Tidak terdapat perbedaan yang berarti terhadap daya berkecambah pada kedua cara pengeringan benih (menggunakan inkubator maupun desikator. Namun demikian, desikator lebih disarankan untuk digunakan dalam penurunan kadar air benih melur. Warna kulit benih hijau memiliki viabilitas yang tinggi dan sangat berbeda dengan benih yang berwarna coklat. Apabila

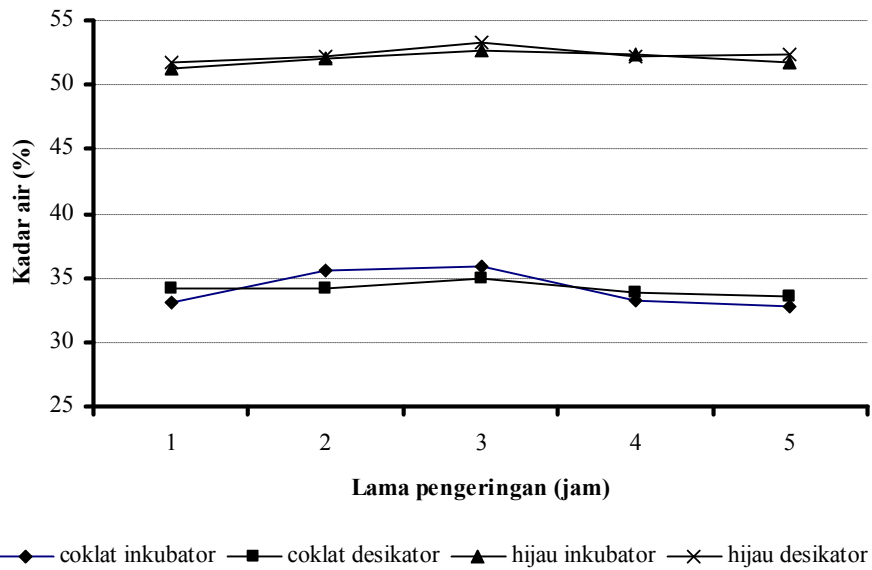
dilihat dari kadar air benih yang terkandung, maka dapat dilihat bahwa benih berwarna coklat memiliki kadar air berkisar antara 33-35%, sedangkan benih berwarna hijau berkisar antara 52-56%. Dari nilai kisaran kadar air benih yang ada, maka dapat diduga bahwa benih melur memiliki kadar air kritis >35%, karena pada kadar air benih 33,69% (benih kontrol) hanya mampu berkecambah sebesar 46,67%. Demikian halnya dengan respon terhadap kecepatan berkecambah yang menunjukkan kecenderungan yang sama dengan daya berkecambah. Grafik kadar air benih dan daya berkecambah melur masing-masing dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2.

Tabel 1. Perlakuan kriopreservasi untuk benih melur

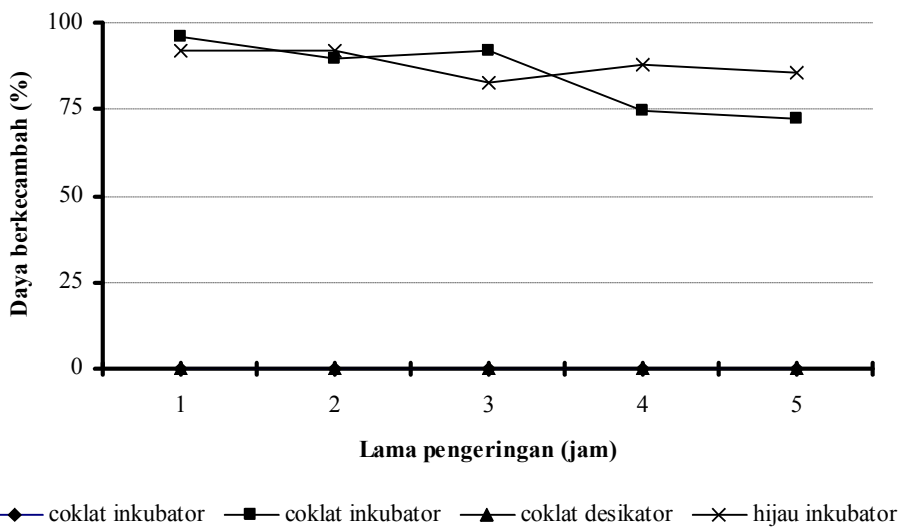
Kode perlakuan	Perlakuan	Krioprotektan	Keterangan
V0 (-V-N)	Tanpa vitrivikasi, tanpa Nitrogen cair	Sukrosa	1 jam
V1 (-V+N)	Tanpa vitrivikasi, celup Nitrogen cair	Sukrosa	1 jam
V2 (+V-N)	Vitrivikasi, tanpa Nitrogen cair	PVS2	1 jam
V3 (+V+N)	Vitrivikasi, celup Nitrogen cair	PVS2	1 jam
V4 (+V-N)	Vitrivikasi, tanpa Nitrogen cair	DMSO	2 jam
V5 (+V+N)	Vitrivikasi, celup Nitrogen cair	DMSO	2 jam

Tabel 2. Nilai rata-rata kadar air (%) benih melur pada berbagai perlakuan pengeringan

Lama pengeringan	Inkubator		<i>Vacuum Desicator</i>	
	Coklat	Hijau	Coklat	Hijau
% Kecambah				
3 jam	33,15	51,31	34,20	51,71
6 jam	35,57	52,03	34,20	52,21
12 jam	35,82	52,74	34,98	53,26
18 jam	33,26	52,31	33,81	52,17
24 jam	32,80	51,71	33,60	52,43
<i>Rataan</i>	<i>34,12</i>	<i>52,02</i>	<i>34,16</i>	<i>52,36</i>
% Kadar Air				
3 jam	0	96	0	92
6 jam	0	89,33	0	92
12 jam	0	92	0	82,67
18 jam	0	74,67	0	88
24 jam	0	72	0	85,33
<i>Rataan</i>	<i>0</i>	<i>84,8</i>	<i>0</i>	<i>88</i>



Gambar 1. Kadar air benih melur pada berbagai metode pengeringan (inkubator dan desikator), warna kulit benih (coklat dan hijau) serta lama pengeringan (jam)



Gambar 2. Daya berkecambah benih melur pada berbagai metode pengeringan (inkubator dan desikator), warna kulit benih (coklat dan hijau) serta lama pengeringan (jam)

Dengan demikian, benih melur berwarna coklat merupakan benih yang tidak dapat digunakan untuk percobaan penyimpanan kriopreservasi karena diduga sudah mengalami penurunan viabilitas. Penurunan viabilitas ini diduga terjadi karena benih yang dikumpulkan sudah beberapa waktu jatuh atau berada di bawah pohon dan terbawa atau tercampur saat pengumpulan.

Hasil analisis keragaman parameter perkecambahan benih melur menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dari warna kulit benih, lamanya pengeringan, interaksinya terhadap daya berkecambah, dan kecepatan berkecambah benih melur. Hasil analisis juga menunjukkan bahwa faktor alat pengering tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, seperti yang terlihat dalam Tabel 3.

Tabel 3. Analisis keragaman parameter perkecambahan benih melur

Perlakuan	Daya berkecambah	Kecepatan berkecambah
A (Alat pengering)	tn	tn
B (Warna buah)	p < 0,01	p < 0,01
C (Lama pengeringan)	p < 0,05	p < 0,05
AxB (interaksi)	p < 0,05	tn
AxC (interaksi)	p < 0,05	p < 0,05
BxC (interaksi)	p < 0,01	p < 0,01
AxBxC (interaksi)	p < 0,01	p < 0,01

Kriopreservasi. Berdasarkan hasil percobaan penurunan kadar air benih, maka untuk percobaan kriopreservasi digunakan benih berwarna hijau dengan kadar air rata-rata 53% (yaitu kondisi kadar air benih setelah benih segar dikeringkan dengan menggunakan *vaccum desicator* selama 24 jam). Hasil pengamatan disajikan pada Tabel 4.

Benih melur yang divitrifikasi dengan DMSO selama 2 jam (V4) mampu menghasilkan daya berkecambah sebesar 66,67%, sedangkan vitrifikasi yang menggunakan krioprotektan sukrosa (V0) dan PVS2 (V2) selama 1 jam masing-masing mempunyai daya berkecambah 53,33% dan 25,33%. Dalam hal ini,

larutan vitrifikasi yang digunakan tidak bersifat phytotoksin karena persentase kecambah yang dihasilkan hampir sama atau bahkan lebih tinggi daripada kontrol yaitu 38,67%. Pembekuan dalam nitrogen cair selama 1 jam untuk semua benih baik yang divitrifikasi maupun tidak divitrifikasi, menyebabkan benih tidak dapat mempertahankan daya berkecambah pada saat pengujian di rumah kaca. Dalam kasus ini ada dugaan bahwa krioprotektan yang digunakan masih belum dapat melindungi benih dari proses kristalisasi selama pembekuan di dalam larutan nitrogen.

Tabel 4. Nilai rata-rata daya berkecambah (%) benih melur pada berbagai perlakuan vitrifikasi (V) dan pembekuan dalam Nitrogen (N)

Perlakuan	Ulangan	Daya berkecambah (%)	Rata-rata (%)
Kontrol	1	12	38,67
	2	56	
	3	48	
V0 (-V-N)	1	56	53,33
	2	56	
	3	48	
V1 (-V+ N)	1	0	0
	2	0	
	3	0	
V2 (+V-N)	1	12	25,33
	2	44	
	3	20	
V3 (+V+N)	1	0	0
	2	0	
	3	0	
V4 (+V-N)	1	80	66,67
	2	68	
	3	52	
V5 (+V+N)	1	0	0
	2	0	
	3	0	

Menurut Chaudhury dan Malik (1999), penggunaan krioprotektan yang lembut kemudian secara perlahan dimasukkan ke dalam suhu rendah atau larutan krioprotektan keras dan dimasukkan dengan cepat kedalam suhu rendah telah banyak diadopsi dalam teknik preservasi kriogenik. Penggunaan

vitrifikasi PVS2 untuk penyimpanan embrio *zygotic* karet dalam cairan nitrogen berhasil mempertahankan viabilitasnya hingga 8 minggu (Sam dan Hor 1999). Hal yang sama terjadi juga pada benih *Podocarpus* spp, dimana benih masih dapat bertahan hingga 6 minggu setelah divitrifikasi dengan PVS2 dan disimpan di

ruang berpengatur udara (Dharmawati dkk. 2005). Penggunaan DMSO dalam vitrifikasi benih rekalsitran matoa (*Pometia pinnata*) dengan metode pembekuan secara lambat dan bertahap setiap 0,5°C/menit sehingga mencapai -10°C dan -20°C, memperlihatkan kemampuan benih dalam mempertahankan viabilitasnya (Sudarmonowati dkk. 1995).

Penggunaan material tanaman dalam bentuk embrio pada penelitian ini tidak dilakukan karena ukuran embrio yang sangat kecil cukup sulit untuk dikeluarkan dari benih. Selain itu, jumlah persediaan benih kurang memadai, sehingga penelitian dengan menggunakan embrio untuk jenis melur perlu dikaji lebih lanjut efektifitasnya. Namun demikian, pada percobaan pendahuluan embrio melur yang dikulturkan di atas kertas saring pada suhu 25°C dapat bertahan hidup dan memperlihatkan pertumbuhan atau perpanjangan embrio.

Kesimpulan

Pengembangan metode vitrifikasi dalam prosedur preservasi kriogenik benih melur masih perlu dievaluasi lebih lanjut karena ketidakkonsistenan hasil yang diperoleh setelah dilakukan pembekuan pada suhu ekstra rendah (196°C) dalam larutan nitrogen.

Saran

Saat ini penggunaan metode kriopreservasi pada sektor kehutanan masih pada taraf penelitian. Namun demikian, pada masa yang akan datang teknik ini akan sangat aplikatif dan bermanfaat khususnya dalam upaya penyelamatan plasma nutfah dari jenis-jenis langka dan hampir punah sertaantisipasi terhadap pengawetan materi hasil pemuliaan.

Daftar Pustaka

- Aitken-Christie, J. dan Singh, A.P. 1987. Cold Storage of Tissue Cultures. *Di dalam* J.M Bonga dan D.J Durzan (eds). Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff, Dordrecht. Hlm.285-304.
- Berjak, P., Kioko, J.I., Walker, M., Mycock, D.J., Wesley-Smith, J., Watt, P., dan Pammenter, N.W. 1999. Cryopreservation-An Elusive Goal. Prosiding IUFRO Seed Symposium 1998. Hlm.96-109.
- Chaudhury, R. dan Malik, S.K. 1999. Cryopreservation and In Vitro Technology for Conservation of Recalcitrant Seeds of Some Tree Species. Prosiding IUFRO Seed Symposium 1998. Hlm.119-131.
- Dumet, D., Engelmann, F., Chabrilange, N., dan Duval, Y. 1993. Cryopreservation of Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Somatic Embryos Involving a Desiccation Step. *Plant Cell Reports*, 12:352-355.
- Dharmawati, F.D., Syamsuwida, D., Muharam, A., Suartana, M., dan Kartiana, E.R. 2005. Metode Kriopreservasi untuk Penyimpanan Benih Rekalsitran. Laporan Hasil Penelitian. Balai Litbang Teknologi Perbenihan, Bogor.
- Engelmann, F. 1992. Cryopreservation of Embryos. *Di dalam* Reproductive Biology and Plant Breeding (Y. Dattee, C. Dumas, dan A. Gallais, eds.). Springer Verlag Berlin. Hlm.281-290.
- _____. 1999. Alternative Methods for The Storage of Recalcitrant Seeds- An Update. *Di dalam* Prosiding IUFRO Seed Symposium 1998, Kuala Lumpur. Malaysia. Hlm.159-170.
- Hong, T. dan Ellis, R.H. 1996. A Protocol to Determine Seed Storage Behaviour. *Di dalam* Engels, J.M.M & Toll, J (Eds). IPGRI Technical Bulletin No.1. IPGRI, Rome, Italy.
- Krishnapillay, B., Tsan, F.Y., Marzalina, M., Jayanthi, N., dan Nashatul Zaimah, N.A. 1999. Slow Growth as a Method to Ensure Continuous Supply of Planting Materials for Recalcitrant Seed Species. *Di dalam* Prosiding IUFRO Seed Symposium 1998, Kuala Lumpur. Malaysia. Hlm.280-285.
- Kamaluddin, M. 1999. Manipulation of Growth Light Environment for Storage of Seedlings of Shade-Tolerant Forest Tree Species in Nursery. *Di dalam* Prosiding IUFRO Seed Symposium 1998, Kuala Lumpur. Malaysia. Hlm.286-295.
- Sudarmonowati, E.S, Fitriyatmi, I., dan Sadjad, S. 1995. Viabilitas Benih Matoa (*Pometia pinnata*) dan Kerabatnya setelah Penyimpanan Suhu Rendah hingga -196°C. Pusat penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Cibinong-Bogor.
- Sakai, A., Kobayashi, S., dan Oiyama, I. 1990. Cryopreservation of Nucellar Cells of Navel Orange (*Citrus sinensis* Osb.var *brasiliensis* Tanaka) by Vitrification. *Plant Cell Reports*, 9:30-33.
- Syamsuwida, D., Aminah, A., Hidayat, A.R., dan Sanusi, A. 2004. Teknik Penyimpanan Benih Rekalsitran dalam Bentuk Semai. Laporan Hasil Penelitian. Balai Litbang Teknologi Perbenihan. Bogor.
- Tompsett, P.B. 1992. A Review of The Literature on Storage of Dipterocarp Seeds. *Seed Science and Technology*, 20:251-267.
- Tsan, F.Y., Jamaluddin, B., Kamis, A., Krishnapillay, B., dan Ang, K.C. 1999. The Growth Performance of *Hopea odorata* Seedlings

Subjected to Application of Paclobutrazol at Two Ages. *Di dalam* Prosiding IUFRO Seed Symposium 1998, Kuala Lumpur. Malaysia. Hlm.297-303.

Thammasiri, K. 1999. Cryopreservation of Embryonic Axes of Jackfruit by Vitrification. *Di dalam* Prosiding IUFRO Seed Symposium 1998, Kuala Lumpur. Malaysia. Hlm.153-158.

Yap, L.V., Hor, Y.L., dan Normah, M.N. 1999. Effects of Sucrose Preculture and Subsequent Desiccation on Cryopreservation of Alginate-Encapsulated *Hevea Brasiliensis* Embryo. *Di dalam* Prosiding IUFRO Seed Symposium 1998, Kuala Lumpur. Malaysia. Hlm.140-145.