

PROSIDING

Seminar Nasional

Bioteknologi & Pemuliaan Tanaman 2006

Auditorium Thoyib Hadiwijaya, Faperta
Institut Pertanian Bogor, 1-2 Agustus 2006



Departemen Agronomi dan Hortikultura
Fakultas Pertanian IPB

Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga 16680
telp/fax. +62 251 629353

“Sinergi Bioteknologi dan Pemuliaan Dalam Perbaikan Tanaman”

dalam rangka purnabakti

**Prof. Dr. G.A. Wattimena
dan**

Prof. Dr. Sarsidi Sastrosumarjo

Departemen Agronomi dan Hortikultura
Fakultas Pertanian
Institut Pertanian Bogor
2006

PELESTARIAN PLASMA NUTFAH KAKAO (*Theobroma cacao* L.) DENGAN SLOW COOLING CRYOPRESERVATION

Dini Hervani¹, Darda Efendi², dan Agus Purwito^{2*}

¹Mahasiswa Pascasarjana IFB,

²Staf pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB

(*Corresponding, E-mail; dinihervani@yahoo.com)

ABSTRACT

One of the importance thing of plant genetic resources is cacao (*Theobroma cacao* L.). Seed of cacao is defined as seeds which are sensitive to desiccation, chilling and cannot be dried below a certain critical moisture level (recalcitrant). It's essential to recognize that owing to the various problems and limitation encountered with both genetic reserves. Cryopreservation currently offers the only safe and cost effective option for the long-term conservation of genetic resources. Somatic embryo from zygotic embryo used as plant material because cell of somatic embryo still in globular fase. Embryo can still alive and has a callus (13.33%) with cryoprotectant's combination contain 15% dimethylsulfoxide (DMSO) and 15% glycerol, thawing 35°C, and grow at MS medium + picloram 0,1 g L⁻¹ + thiamin 0,2 g L⁻¹ + IAA 1 ml L⁻¹ + kinetin 0,1 ml L⁻¹.

Key words : cacao – germplasm – cryopreservation

PENDAHULUAN

Keragaman genetik suatu spesies tanaman dapat menurun karena usaha manusia untuk menanam atau memperluas jenis-jenis unggul baru sehingga jenis-jenis lokal yang amat beragam akan terdesak bahkan dapat lenyap. Plasma nutfah merupakan salah satu faktor sumber keragaman genetik yang dapat menunjang keberhasilan suatu program pemuliaan, karena dengan adanya keragaman genetik maka kita dapat merakit suatu varietas dengan sifat yang kita inginkan (Poespodarsono 1988).

Benih kakao memiliki karakteristik rekalsitran dan sensitif terhadap *chilling* sehingga tidak memungkinkan untuk disimpan dalam waktu yang lama. Dimasa yang akan datang, jika mempertahankan keberadaan plasma nutfah kakao dengan cara membuat kebun koleksi dikhawatirkan akan terbentur dengan masalah keterbatasan lahan, biaya, waktu, dan resiko terhadap plasma nutfah karena kondisi alam serta gangguan lingkungan abiotik dan biotik (Florin *et al.* 2000).

Cara yang paling memungkinkan untuk konservasi plasma nutfah terutama untuk tanaman yang menghasilkan benih rekalsitran adalah kriopreservasi. Kriopreservasi (*cryopreservation*) merupakan suatu alternatif penyimpanan dengan cara melakukan pembekuan menggunakan nitrogen cair (-196°C) terhadap suatu bahan tanaman. Teknik kriopreservasi yang sering dilakukan adalah teknik kriopreservasi *slow cooling* dan *fast freezing*. Pada kriopreservasi *slow cooling* meliputi tahapan perendaman bahan tanam dalam larutan krioprotektan dan di tempatkan pada suhu -80°C, selanjutnya diikuti dengan pencelupan dalam nitrogen cair. Pada kriopreservasi *fast freezing* dengan cara merendam bahan tanam pada krioprotektan dan selanjutnya dilakukan proses pembekuan cepat dengan cara mencelupkan bahan tanam secara langsung ke dalam nitrogen cair (Engelmann 2000).

Pada saat tanaman ditempatkan pada suhu yang sangat rendah maka kerusakan sel bisa terjadi. Membran sel tanaman akan bertindak sebagai penghambat pembentukan kristal es secara fisik akan tetapi sel banyak mengandung air sehingga tidak akan bertahan jika menghadapi suhu nitrogen cair yang sangat rendah. Selama pembekuan dan pelelehan, sel tanaman dapat mengalami kerusakan akibat: dipaksa untuk menghadapi suhu yang sangat rendah, terbentuknya kristal es, dan mengalami dehidrasi (Reinhoud *et al.* 2000).

Kerusakan sel pada saat bahan tanam menghadapi suhu yang membekukan dapat diatasi dengan melakukan tahapan dehidrasi atau pengeringan untuk menghindari pembentukan kristal es dengan menggunakan krioprotektan (misalnya glyserol, dimethylsulfoxide (DMSO), ethane- or propanediol, dan gula) (Reinhoud *et al.* 2000).

TUJUAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan proses penyimpanan embrio somatik kakao yang terbaik melalui *slow cooling cryopreservation*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. Penelitian dimulai dari bulan November 2005 sampai dengan Juli 2006.

Tahapan Pelaksanaan Penelitian

Penyediaan sumber eksplan dan media

Eksplan berupa embrio zigotik yang diambil dari biji buah muda kakao varietas UAH (Upper Amazon Hybrid) yang telah disterilisasi. Sterilisasi buah muda kakao dilakukan dengan cara perendaman dalam larutan bayclin 5% selama 15 menit sambil sekali-kali dikocok setelah itu dibilas dengan air yang mengalir, selanjutnya di dalam LAFK sterilisasi buah dengan cara pencelupan dalam alkohol 70% dan dibakar diatas nyala api spiritus dan diulang sebanyak 3 kali, kemudian buah dibuka kulit dan diambil bijinya.

Embrio yang diambil panjangnya 0,5-1,0 cm. Media yang dipergunakan untuk pertumbuhan embrio berupa media MSo yang ditambah 0,1 g L⁻¹ casein hidrolisat, 100 ml L⁻¹ air kelapa dan 30 g L⁻¹ sukrosa. IAA 1 ml L⁻¹ dan selanjutnya pH media diatur 5,8 dan ditambah agar 7,5 g L⁻¹ (Chaidamsari 1998). Embrio somatik yang telah tumbuh, selanjutnya akan disimpan secara kriopreservasi. Protokol untuk prosedur kriopreservasi dengan teknik *slow cooling* dapat dilihat pada Gambar 1.

Metode Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam percobaan ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) disusun secara faktorial dengan 2 faktor.

Faktor I adalah kombinasi konsentrasi krioprotektan dimethylsulfoxide (DMSO) dan gliserol dalam larutan MSo dengan 4 taraf konsentrasi yaitu :

A1 = 5 %

A2 = 10 %

A3 = 15 %

A4 = 20 %

Faktor II adalah berbagai macam media pemulih dengan 3 taraf yaitu :

B1 = media MS + picloram 0,1 g L⁻¹ + thiamin 0,4 g L⁻¹ + IAA 1 ml L⁻¹ + kinetin 0,2 ml L⁻¹

B2 = media MS + picloram 0,1 g L⁻¹ + thiamin 0,2 g L⁻¹ + IAA 1 ml L⁻¹ + kinetin 0,1 ml L⁻¹

B3 = media MS + 2,4-D 2 ml L⁻¹ + kinetin 0,1 ml L⁻¹

Perlakuan diulang 10 kali dan setiap satuan percobaan terdiri dari 3 eksplan

HASIL

1. Umur muncul pertama embrio somatik atau kalus (hari ke-)

Percobaan kriopreservasi dengan teknik *slow cooling* untuk eksplan berupa embrio somatik, terdapat beberapa eksplan yang mampu tumbuh setelah disimpan pada nitrogen cair (N₂). Eksplan mulai menunjukkan reaksi pertumbuhan setelah stagnasi selama 6 bulan dan kalus mulai muncul pada hari ke 171 yaitu pada perlakuan krioprotektan konsentrasi 15% dan pada media MS + picloram 0,1 g L⁻¹ + thiamin 0,2 g L⁻¹ + IAA 1 ml L⁻¹ + kinetin 0,1 ml L⁻¹ dan eksplan juga mulai tumbuh pada hari ke 180 pada perlakuan krioprotektan konsentrasi 15% dan pada media MS + 2,4-D 2 ml L⁻¹ + kinetin 0,1 ml L⁻¹.

Pada kombinasi perlakuan yang lain, tidak ada satu pun embrio somatik yang mampu tumbuh. Hasil percobaan untuk pengamatan umur muncul pertama embrio somatik atau kalus pada berbagai media pemulih ini dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil percobaan untuk pengamatan rata-rata umur muncul pertama embrio somatik atau kalus ini dapat dilihat pada Tabel 1.

2. Jumlah embrio somatik yang bertahan hidup

Eksplan tetap bertahan hidup dalam botol kultur, tetapi eksplan tidak menunjukkan pertumbuhan apa-apa (stagnasi) dan eksplan juga tidak mati. Sampai akhir penelitian, rata-rata jumlah eksplan yang tetap bertahan hidup dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa hasil sidik ragam menunjukkan hasil yang berbeda nyata pada masing-masing perlakuan dan tidak terjadi interaksi antara krioprotektan dan media pemulih. Hasil uji lanjut pada pengaruh berbagai konsentrasi krioprotektan menunjukkan hasil bahwa konsentrasi krioprotektan sebanyak 15% memberikan hasil yang berbeda nyata terhadap konsentrasi 5% dan 10%. Hasil uji lanjut pada macam media pemulih menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan media I (media MS + picloram $0,1 \text{ g L}^{-1}$ + thiamin $0,4 \text{ g L}^{-1}$ + IAA 1 ml L^{-1} + kinetin $0,2 \text{ ml L}^{-1}$) dan dengan media II (media MS + picloram $0,1 \text{ g L}^{-1}$ + thiamin $0,2 \text{ g L}^{-1}$ + IAA 1 ml L^{-1} + kinetin $0,1 \text{ ml L}^{-1}$). Perkembangan eksplan sebelum dan sesudah proses kriopreservasi dapat dilihat pada Gambar 2.

PEMBAHASAN

Terbatasnya perkembangan kriopreservasi pada spesies rekalsitran karena jumlah spesiesnya yang banyak dan sebagian besar merupakan spesies liar sehingga informasi kehidupan secara fisiologi dan kimiawi sedikit. Selain itu, benih dan embrio dari spesies rekalsitran sering mengalami kesulitan untuk tumbuh kembali setelah melewati proses kriopreservasi karena kompleksnya komposisi jaringan sehingga banyak perbedaan sensitifitas terhadap pengeringan dan pembekuan (Engelmann 2000).

Pada proses slow cooling kriopreservasi, terjadi proses dehidrasi secara perlahan tanpa terjadinya pembekuan pada intrasellular, selanjutnya air dari dalam sel dikeluarkan dari sel dan digantikan dengan larutan (krioprotektan) yang tidak akan membentuk kristal es. Jika kristal es terbentuk didalam sel maka sel akan mengalami stress secara mekanik sehingga formasi sel rusak dan jaringan sel pun rusak, menyebabkan lisis sel karena es yang terbentuk antara dinding sel membuat protoplasma menyusut sehingga permukaan membran plasma mengalami adhesi yang dapat membuat sel menjadi lisis, terbentuknya gelembung gas pada intrasellular, dan tidak terjadinya interaksi elektrik karena permukaan membran yang tertutup oleh es (Grout 1995).

Kerusakan sel pada saat bahan tanam menghadapi suhu yang membekukan dapat diatasi dengan melakukan tahapan dehidrasi atau pengeringan untuk menghindari pembentukan kristal es dengan menggunakan krioprotektan (misalnya glyserol, dimethylsulfoxide (DMSO), ethane- or propanediol, dan gula). Beberapa krioprotektan akan masuk dalam sel dan tampak bereaksi pada sisi luar sel. Fungsi krioprotektan untuk merubah beberapa properti air seperti menurunkan titik beku air dan mencapai titik transisi sebelum terjadinya nukleasi es didalam sel karena pada kondisi seluler, titik transisi dapat dicapai pada suhu sekitar $-100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ sedangkan kristal es terbentuk sebelum suhu tersebut tercapai. Kombinasi krioprotektan sangat penting dalam kriopreservasi karena krioprotektan dapat bersifat meracuni sel tanaman jika digunakan pada konsentrasi yang tinggi atau pada suhu yang tinggi (Reinhoud *et al.* 2000).

Kombinasi DMSO dan gliserol dengan konsentrasi masing-masingnya sebanyak 15% mampu melindungi eksplan dari kerusakan akibat penyimpanan dengan suhu yang rendah. DMSO dan gliserol merupakan krioprotektan bersifat permeating yang berarti krioprotektan tersebut dapat masuk ke dalam sel (Karthi 1985). Pada konsentrasi yang tepat, gliserol dapat bertindak sebagai bahan untuk anti beku, dapat mengurangi pembentukan kristal es, membantu pencapaian konsentrasi ekstraselular yang tepat dan mengatasi kekurangan air pada sel. DMSO sebagai krioprotektan juga sangat efektif (Karthi 1985).

Komposisi media pemulih untuk penanaman eksplan kembali setelah proses kriopreservasi sangat penting karena media pemulih harus dapat menyerap kembali krioprotektan yang berada di eksplan. Kandungan air dalam eksplan akan menentukan viabilitas eksplan pada masing-masing perlakuan setelah penyimpanan secara kriopreservasi dan aktifitas katabolisme pada bagian yang mengandung krioprotektan setelah proses thawing dapat menyebabkan kerusakan yang tidak dapat diperbaiki kembali (Steward *et al.* 2001).

Adanya kemampuan tumbuh kembali pada embrio somatik disebabkan karena ukuran sel pada embrio ini masih kecil dan masih dalam fase globular sehingga sangat sedikit mengandung air sehingga pembentukan kristal es dapat dicegah. Dinding sel pada embrio somatik juga berperan penting dalam sistem pertahanan embrio somatik.

Menurut Ishikawa *et al.* (2000), dinding sel bekerja sebagai suatu penghalang untuk mencegah terjadinya kristal es ke dalam suatu sel dan secara serentak juga sebagai penghalang melawan terhadap pergerakan air dari sel ke extracellular membeku. Dinding sel perlu mempunyai kekuatan-tarik cukup untuk melawan tekanan hidrostatik yang negatif sebagai hasil beda tegangan uap antara air dan es.

Air merupakan salah satu komponen yang penting dalam sistem kehidupan berdasarkan pengamatan secara struktural dan regulasinya dalam setiap proses kehidupan. Pengaturan status air selama proses kriopreservasi merupakan kunci factor dalam perkembangan keberhasilan strategi krioprotektif dan mengatasi kerusakan akibat proses kriopreservasi. Air yang berada dalam jaringan biologis bersifat bebas dan akan berubah menjadi es bila ditempatkan dalam suhu yang membekukan sehingga dapat mengakibatkan kerusakan pada sel. Ada dua faktor hipotesis yang mengakibatkan kerusakan selama proses kriopreservasi berdasarkan pembentukan kristal es yaitu pembekuan secara cepat terjadi secara besar pada intraseluler sehingga sel menjadi rusak dan factor kedua adalah kerusakan akibat dehidrasi yang terjadi setelah kristal es terbentuk. Pada slow cooling dan pada saat kristalisasi terinduksi untuk pertama kalinya pada bagian ekstraselular maka akan memberikan kontribusi kerusakan akibat dehidrasi osmotik yang terjadi di intraseluler sel, dimana air yang belum membentuk kristal dipindahkan dari dalam sel ke luar (Dumet dan Benson 2000).

Dapat dijelaskan bahwa proses kriopreservasi meliputi proses pembekuan-penyimpanan-hawing-penanaman kembali merupakan rangkaian proses yang tidak dapat dipisahkan. Kesalahan yang terjadi pada salah satu faktor dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan pada sistem penyimpanan (Bajaj 1995).

KESIMPULAN

Eksplan kakao yang berupa embrio somatik dapat tumbuh kembali setelah dilakukan penyimpanan secara slow cooling kriopreservasi pada Media MS + picloram $0,1 \text{ g L}^{-1}$ + thiamin $0,2 \text{ g L}^{-1}$ + IAA 1 ml L^{-1} + kinetin $0,1 \text{ ml L}^{-1}$ dengan konsentrasi krioprotektan 15% tetapi tidak ada terjadi interaksi antara perlakuan media pemulih dan konsentrasi krioprotektan. Eksplan membutuhkan waktu yang lama untuk memulihkan kembali keadaannya yaitu selama 6 bulan. Kombinasi krioprotektan dan media pemulih yang tepat dapat membantu recovery sel eksplan setelah proses kriopreservasi sehingga eksplan dapat tumbuh dan berkembang kembali.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Dr. Ir. Darda Efendi, M.Si dan Bapak Dr. Ir. Agus Purwito, M.Sc.Agr yang telah mengarahkan dan membimbing penulis dalam pelaksanaan penelitian ini.

Tabel 1. Rata-rata umur muncul pertama embrio somatik pada berbagai media (hari ke-)

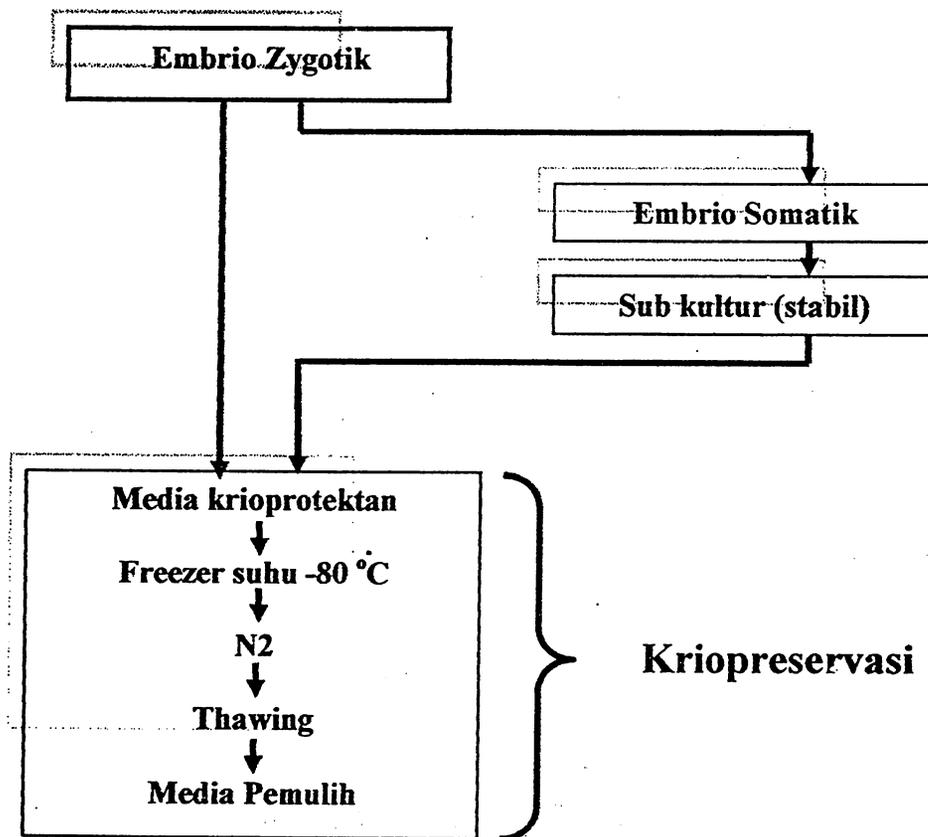
Konsentrasi Krioprotektan (%)	Macam-macam Media		
	B1	B2	B3
5	-	-	-
10	-	-	-
15	-	177,8	187,5
20	-	-	-

Tabel 2. Rata-rata jumlah embrio somatik yang bertahan hidup pada berbagai media pemulih

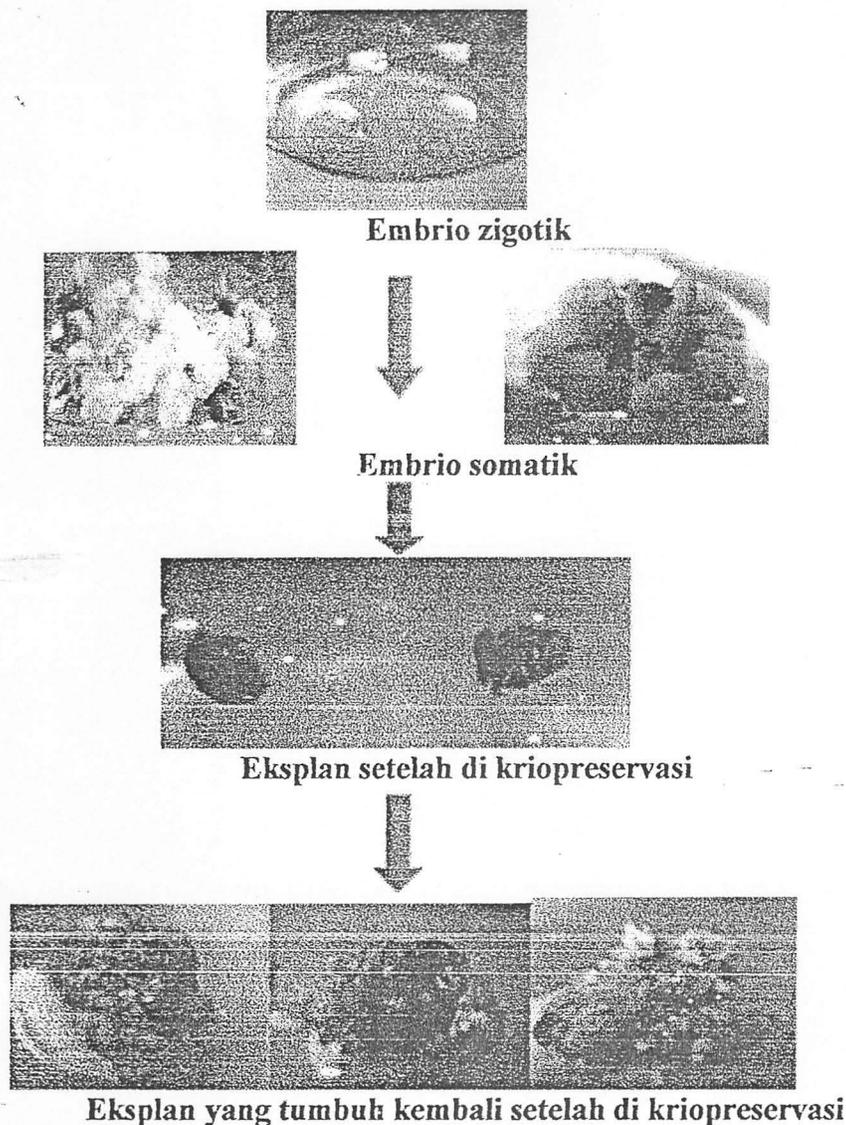
Media Pemulih	Kosentrasi Krioprotektan (%)				Pengaruh Utama Media
	5	10	15	20	
Media I	1,02	1,00	1,02	1,02	1,02a
Media II	1,12	1,22	11,37	1,25	1,24b
Media III	1,02	1,05	1,32	1,19	1,15ab
Pengaruh Utama Krioprotektan	1,065 A	1,09 AC	1,24 B	1,15 AB	1,13

KK= 12,50 %

Angka-angka pada baris yang sama diikuti oleh huruf besar yang sama dan angka-angka pada lajur yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama adalah berbeda tidak nyata pada taraf nyata 5% menurut DMRT



Gambar 1. Diagram alir prosedur kriopreservasi dengan teknik *slow cooling*



Gambar 2. Perkembangan eksplan dalam percobaan kriopreservasi

DAFTAR PUSTAKA

- Bajaj YPS. 1995. Cryopreservation of plant cells, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* Vol. 32.
- Chaidamsari T. 1998. Transformasi genetik pada tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. (Tesis). Departemen Bioteknologi. IPB. Bogor
- Dumet D, Benson EE. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. *JIRCAS International Agricultural Series*. 8: 43-56.
- ngelmann F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. *JIRCAS International Agricultural Series*. 8: 3-16.
- Florin B, Brulard E, Petlard V. 2000. In-vitro cryopreservation of cacao genetic resources. *JIRCAS International Agriculture Series* 8: 344-347.
- Grout B. 1995 Genetic preservation of plant cells in vitro. Springer. Germany
- Ishikawa M, Ide H, Price WS, Arata Y, Kitashima T. 2000. Freezing behaviours in plant tissues as visualized by nmr microscopy and their regulatory mechanisms. *JIRCAS International Agricultural Series*. 8: 22-34.
- Kartha KK. 1985. Cryopreservasi of plant cells and organ. CRC Press. Boca Raton Florida. pp 276.
- Poespodarsono S. 1988. Dasar-dasar ilmu pemuliaan. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Reinhouid PJ, Iren FV, Kijne JW. 2000. Cryopreservation of undifferentiated plant cells. *JIRCAS International Agricultural Series* 8: 91-102.
- Steward P, Taylor M, Mycock D. 2001. The sequence of the preparative procedures affects the success of cryostorage of cassava somatic embryos. *Cryoletters* 22 pp 35-42.