

KRIOPRESERVASI:

KONSERVASI SUMBER DAYA GENETIK KELAPA SAWIT JANGKA PANJANG

Ernayunita, Sri Wening, Nanang Supena, Taryono¹

Abstrak - Penyimpanan sumber daya genetik kelapa sawit dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya dengan metode kriopreservasi yang mampu menyimpan sumber daya genetik dalam jangka waktu yang cukup lama. Pada kelapa sawit, metode kriopreservasi yang banyak digunakan adalah metode kriopreservasi klasik dan metode baru diantaranya vitrifikasi dan *droplet*-vitrifikasi. Bahan kelapa sawit yang disimpan diantaranya embrio zigotik, kernel, kalus, suspensi sel dan sel embriogenik dari suspensi sel, dan embrio somatik. Dari berbagai jenis bahan tersebut, kebanyakan menggunakan embrio somatik yang dihasilkan dari perbanyakan menggunakan kultur jaringan. Penggunaan embrio somatik dinilai lebih mudah dilakukan dan mampu menghasilkan pertumbuhan kembali setelah kriopreservasi dengan persentase keberhasilan yang cukup tinggi.

Kata kunci: kriopreservasi, kelapa sawit, sumber daya genetik.

PENDAHULUAN

Kegiatan pemuliaan tanaman tidak dapat dilepaskan dari pemanfaatan bahan genetik yang berasal dari koleksi sumber daya genetik. Koleksi sumber daya genetik disimpan dalam berbagai cara untuk memastikan ketersediaan sumber daya genetik saat dibutuhkan. Metode penyimpanan koleksi sumber daya genetik yang biasa dilakukan adalah dengan menanam pohon sumber daya genetik di kebun-kebun koleksi maupun menyimpan dalam bentuk benih di bank benih (*seed bank collection*) dan disimpan dalam bentuk koleksi bahan kultur jaringan dengan pertumbuhan minimal (Leunufna, 2019).

Penyimpanan sumber daya genetik kelapa sawit di kebun-kebun benih menghadapi kendala kemungkinan hilangnya sumber genetik yang dapat disebabkan karena adanya cekaman abiotik maupun biotik. Cekaman biotik yang paling mendominasi yaitu tingginya intensitas serangan hama dan penyakit terutama infeksi jamur *Ganoderma boninense* yang

dapat menyebabkan tanaman mati hingga mencapai 80% (Reed et al., 2011). Cekaman abiotik yang sering terjadi di kebun kelapa sawit adalah cekaman kekeringan. Apabila hal ini terjadi pada kebun koleksi genetik kelapa sawit maka ancaman kehilangan sumber daya genetik akan sangat besar.

Penyimpanan koleksi sumber daya genetik kelapa sawit jangka panjang dalam bentuk benih di ruang penyimpanan benih juga beresiko, terutama apabila penyimpanan benih dilakukan untuk kurun waktu puluhan tahun. Benih kelapa sawit merupakan benih semi rekalsitran dan tidak mampu disimpan dalam jangka waktu lama. Viabilitas benih kelapa sawit masih dapat dipertahankan dengan penyimpanan 12-15 bulan pada suhu 15^oC dengan kelembaban 10-15%, akan mengalami deteriorasi dan penurunan viabilitas seiring dengan lamanya waktu simpan benih (Rajanaidu dan Ainul, 2013). Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk menyimpan sumber daya genetik dalam jangka waktu yang cukup lama, salah satunya menggunakan teknik kriopreservasi.

Kriopreservasi diartikan sebagai salah satu teknik penyimpanan jaringan tanaman menggunakan suhu sangat rendah (-196^oC) pada media kriogenik menggunakan nitrogen cair. Teknik penyimpanan ini sudah cukup lama dilakukan dan diinisiasi sejak 1937. Kriopreservasi sangat potensial digunakan, karena pada suhu yang sangat rendah semua sel dan proses metabolisme dalam kondisi yang sangat lambat

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Ernayunita(✉)
Pusat Penelitian Kelapa Sawit
Jl. Brigjen Katamso No. 51 Medan, Indonesia
Email: ernayunita_25@yahoo.com

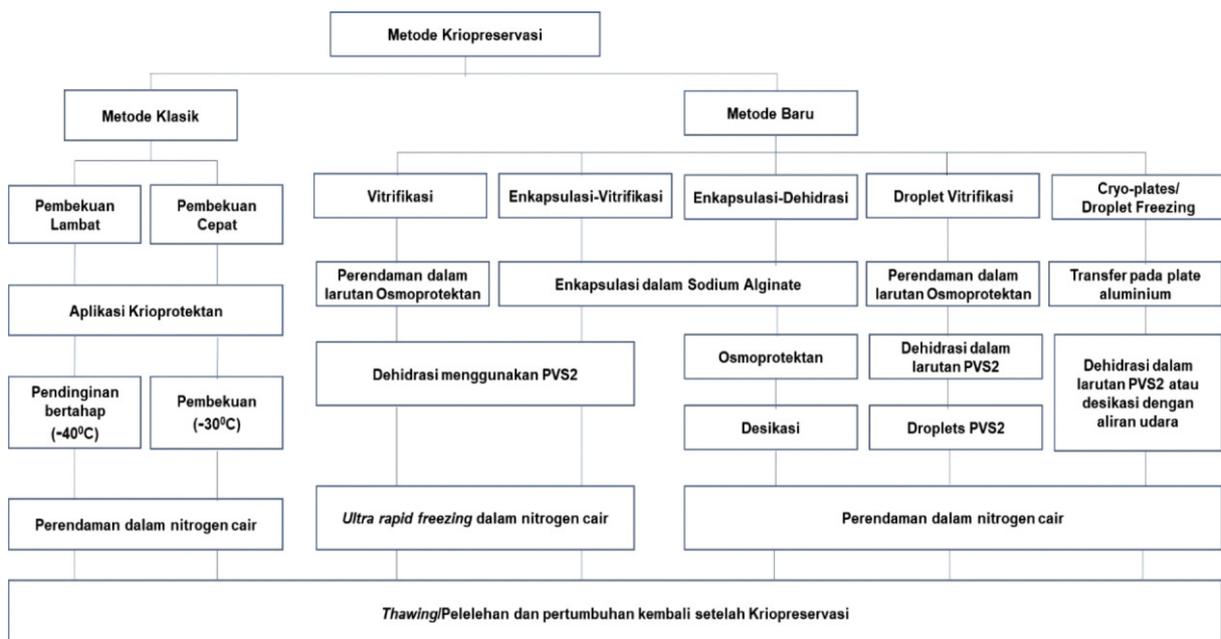
¹ Universitas Gadjah Mada, Fakultas Pertanian, Jl. Flora, Bulaksumur, Karang Malang, Caturtunggal, Kec. Depok, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta 55281

bahkan berhenti (da Silva dan Engelmann, 2017). Kriopreservasi menggunakan nitrogen cair sehingga selama penyimpanan sel-sel ditekan aktivitasnya atau bahkan sama sekali tidak memiliki aktifitas metabolisme dengan viabilitas sel yang tetap terpelihara, bahan tanam dapat disimpan dalam jangka waktu hingga puluhan tahun dalam tabung kriopreservasi sehingga tidak diperlukan lahan yang luas dan bebas ancaman cekaman biotik dan abiotik seperti halnya koleksi sumber daya genetik di kebun-kebun koleksi.

Tulisan ini membahas mengenai kriopreservasi untuk penyimpanan sumber daya genetik secara umum dan khususnya kelapa sawit. Selain itu, dibahas tahapan-tahapan masing-masing metode kriopreservasi secara singkat dalam penyimpanan sumber daya genetik kelapa sawit berdasarkan jenis bahan yang disimpan.

METODE KRIOPRESERVASI

Secara umum, kriopreservasi dibedakan menjadi 2 metode yaitu kriopreservasi klasik yang didasarkan pada dehidrasi sel yang diinduksi pada suhu rendah (di bawah 0°C) atau *freeze-induced dehydration* dan metode baru yang didasarkan pada dehidrasi sel pada suhu di atas 0°C atau vitrifikasi (Gambar 1). Metode berbasis vitrifikasi didasarkan pada pembentukan struktur menyerupai kaca (*meta-stable glass*) pada suhu yang sama dengan atau di bawah titik beku larutan tertentu. Masing-masing metode kriopreservasi terbagi menjadi beberapa tahapan metode yang berbeda-beda Gambar 1. Perbedaan metode yang dikembangkan dalam penyimpanan menggunakan kriopreservasi didasarkan pada bahan tanaman yang akan disimpan.



Gambar 1. Bagan Metode Kriopreservasi
 Sumber: Jiroutova dan Sedlak (2020) yang dimodifikasi

Penjelasan mengenai metode kriopreservasi dengan metode klasik dan baru, dijelaskan secara singkat sebagai berikut:

1. Kriopreservasi dengan Metode Klasik

Pada metode klasik, tahapan yang dilakukan di antaranya *pregrowth*, pemberian krioprotektan,

pembekuan dalam nitrogen cair, pencairan kembali, pemulihan bahan:

a. *Pregrowth*

Tahapan *pregrowth* merupakan perlakuan khusus yang digunakan untuk mempersiapkan bahan yang akan disimpan agar memiliki ketahanan terhadap

pembekuan minimal. Tahap persiapan ini beragam, tergantung pada sistem kultur dan spesies. Modifikasi metode ini yaitu preculture-dehydration yaitu persiapan bahan sebelum kriopreservasi terutama untuk bahan yang tidak tahan pengeringan. Sebelum pembekuan cepat dilakukan pengeringan dalam *laminar air flow* (LAF) menggunakan *silica gell* (Gantait et al., 2017).

b. Krioprotektan

Tahapan krioprotektan adalah pemberian bahan kimia tertentu lebih kurang satu jam sebelum pembekuan yang dapat membawa perubahan pada permeabilitas, titik beku, dan tanggapan sel terhadap cekaman pembekuan serta pemulihan bahan setelah penyimpanan agar bahan yang disimpan tetap hidup. Krioprotektan berfungsi memelihara cairan dalam sel saat sel berada pada suhu yang rendah, meningkatkan dehidrasi sel, dan menjaga stabilitas membran sel. Krioprotektan terbagi menjadi 2 yaitu krioprotektan yang dapat masuk ke dalam sel (intraseluler) seperti *dimethyl sulfoksida* (DMSO) dan *polyethylene glikol* (PEG), serta krioprotektan yang dapat masuk ke dalam ruang antarsel (ekstraseluler) seperti sukrosa dan sorbitol. Selain itu juga campuran dari beberapa krioprotektan yang terdiri dari sukrosa, gliserol, *etilen glicol-EG*, *dimetilsulfocida-DMSO* yang disebut *Plant Vitrification Solution 2* (PVS2) yang dapat melindungi jaringan setelah pembekuan dalam nitrogen cair dengan tingkat daya hidup dan regenerasinya cukup tinggi (Reed, 2011).

c. Pembekuan dalam nitrogen cair dan penyimpanan

Lamanya proses pembekuan dalam nitrogen cair menjadi tahapan penting dalam penyimpanan kriopreservasi karena lamanya waktu pembekuan tergantung pada bahan yang disimpan. Pembekuan lambat cocok digunakan untuk bahan dari suspensi sel dan protoplas, sedangkan metode pembekuan cepat lebih sesuai untuk bahan berupa meristem, kernel, polen, dan embrio somatik (Jiroutova dan Sedlak, 2020).

d. Thawing

Tahapan thawing atau pelelehan kembali bahan setelah disimpan dalam kriopreservasi merupakan tahapan yang kritis dalam keberhasilan kriopreservasi. Dalam tahap ini diperlukan suatu teknik peningkatan suhu yang dapat melindungi jaringan dari pecahnya sel akibat kenaikan suhu yang terlalu cepat atau

rekristalisasi pada sel yang telah dilakukan proses *thawing* (Engelmann et al., 1985).

e. Post-Thaw Phase (recovery bahan tanaman setelah penyimpanan)

Post-Thaw Phase merupakan tahapan pemulihan kembali bahan setelah disimpan dengan kriopreservasi. Pada tahapan ini, bahan yang disimpan akan kembali seperti pada keadaan semula sebelum dilakukan kriopreservasi (Engelmann et al., 1985).

2. Kriopreservasi dengan Metode Baru

a. Vitrifikasi

Vitrifikasi yaitu kriopreservasi menggunakan larutan dengan molaritas sangat tinggi seperti PVS2 (*Plant Vitrification Solution 2*). Larutan dengan molaritas tinggi bersifat kental sehingga dapat menghambat kristalisasi es, baik intraseluler maupun ekstraseluler, selama pembekuan dalam nitrogen cair (Gantait et al., 2017).

b. Enkapsulasi-dehidrasi

Enkapsulasi-dehidrasi menggunakan gel alginat sebagai pembungkus eksplan sebelum dilakukan dehidrasi menggunakan eksikator atau *laminar flow box*.

c. Enkapsulasi-vitrifikasi merupakan kombinasi 2 metode yaitu metode enkapsulasi-dehidrasi dengan metode vitrifikasi (Gantait et al., 2017).

d. Droplet-vitrifikasi merupakan modifikasi dari metode dasar vitrifikasi dengan metode penempatan bahan dalam bentuk tetesan atau droplet ukuran 1-10 μl dalam larutan krioprotektan yang diteteskan pada selembur aluminium foil (Gambar 2), sebelum direndam dalam nitrogen cair (Kaczmarczyk et al., 2012).

e. *Cryo-plates* merupakan metode yang diawali dengan pra perlakuan bahan tanaman ke dalam media cair yang mengandung krioprotektan kemudian diikuti dengan droplet krioprotektan dan pembekuan cepat. Pada metode droplet, eksplan dibungkus dengan tetesan krioprotektan DMSO pada aluminium foil sebelum dimasukkan kedalam nitrogen cair. Metode kriopreservasi dengan *cryo-plates* juga dapat menggunakan saringan berukuran mikro (*cryo-mesh*). Metode *cryo-plates* biasanya digunakan untuk bahan

berupa *shoot-tips* atau tunas yang masih sangat muda (Funnekotter et al., 2017), sehingga untuk kelapa sawit kurang aplikatif.

Pada berbagai metode yang sudah dirincikan sebelumnya, secara umum metode-metode tersebut melibatkan beberapa proses umum yang harus dilakukan diantaranya persiapan bahan sebelum penyimpanan dalam nitrogen cair, metode untuk melindungi material dari *freezing injury* akibat pembekuan dalam nitrogen cair, proses *thawing* setelah penyimpanan dan media untuk pertumbuhan kembali bahan setelah penyimpanan menggunakan kriopreservasi (Jiroutova dan Sedlak, 2020). Pada kelapa sawit, banyak menggunakan metode kriopreservasi klasik diantaranya *pregrowth*, pemberian krioprotektan, pembekuan cepat, serta *thawing* dan metode baru diantaranya vitrifikasi dan *droplet*-vitrifikasi.

KRIOPRESERVASI KELAPA SAWIT

Kriopreservasi kelapa sawit pertama kali menggunakan bahan berupa embrio zigotik dengan metode kriopreservasi klasik yang masih sederhana (Grout et al., 1983). Pada awalnya, penyimpanan kriopreservasi kelapa sawit menggunakan benih dan kernel. Namun, penyimpanan kriopreservasi menggunakan benih dan kernel tidak tahan terhadap desikasi dan paparan suhu yang rendah (Norziha et al., 2017).

Dalam perkembangannya, penyimpanan sumber daya genetik kelapa sawit dengan kriopreservasi mayoritas menggunakan bahan berupa embrio somatik yang dihasilkan dari perbanyakan menggunakan kultur jaringan. Penggunaan embrio somatik dinilai lebih mudah dilakukan dan mampu menghasilkan pertumbuhan kembali setelah kriopreservasi dengan persentase keberhasilan yang cukup tinggi. Oleh karena itu, penyimpanan kriopreservasi menggunakan embrio somatik lebih diminati. Bahan lain yang juga digunakan dalam penyimpanan kriopreservasi kelapa sawit yaitu kernel, polen, kalus, suspensi sel dan sel embriogenik dari suspensi sel (da Silva dan Engelmann, 2017).

Tahapan proses kriopreservasi yang dapat digunakan tergantung pada masing-masing bahan kelapa sawit yang disimpan:

1. Kriopreservasi Embrio Zigotik dan Kernel Kelapa Sawit

Grout et al. (1983) menggunakan embrio kelapa sawit yang diisolasi dari bagian benihnya dengan metode kriopreservasi klasik. Tahapan yang dilakukan sangat sederhana yaitu benih dipecahkan cangkangnya kemudian embrio diambil dari bagian inti benih dalam kondisi steril. Kemudian embrio didehidrasi dengan cara dikeringkan dan diletakkan pada cawan petri terbuka di LAF selama 6 jam dalam konsisi tetap steril. Setelah itu, embrio diletakkan pada tabung wadah (*vial*) dan ditutup rapat kemudian dimasukkan dalam nitrogen cair -196°C . Proses *thawing* dilakukan dengan merendam *vial* yang berisi embrio ke dalam air dengan suhu 10°C - 30°C . Pengecambahan embrio dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan media MS diperkaya 1 g/l kasein hidrolisat, 3 g/l sukrosa, 0,5 mg/l IAA, 0,1 mg KN, dan 8 g/l agar. Hasil penyimpanan dalam kriopreservasi selama 8 bulan menunjukkan tidak ada penurunan viabilitas benih.

Engelmann et al. (1985) mengembangkan penelitian kriopreservasi kelapa sawit berdasarkan metode yang telah dilakukan Grout et al. (1983). Tahapan awal yang dilakukan dengan penurunan kadar air embrio zigotik sebelum penyimpanan dalam kriopreservasi. Embrio diletakkan dalam 2 ml-*propylene cryotubes* kemudian direndam dalam nitrogen cair. Setelah penyimpanan, embrio masuk tahap pelelehan dengan memasukkan *cryotubes* selama 1 menit pada suhu 40°C , dan ditumbuhkan kembali pada media *in vitro* menggunakan MS modifikasi. Persentase pertumbuhan kembali embrio zigotik dari penelitian ini yaitu 25% setelah disimpan menggunakan kriopreservasi. Berbeda dengan embrio zigotik, penyimpanan menggunakan kernel dilakukan dengan 2 tahap untuk mencegah kerusakan saat pendinginan dan *thawing*.

Norziha et al. (2017) mengembangkan kembali metode kriopreservasi untuk embrio zigotik kelapa sawit. Tahapan yang dilakukan yaitu benih kelapa sawit dipecahkan cangkangnya kemudian diambil bagian kernelnya dan disterilisasi menggunakan campuran 0,05% *Tween 20* dan 0,01% *mercuric chloride*. Setelah itu, dilakukan pembilasan menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Kemudian dilakukan desikasi benih untuk menurunkan kadar air embrio menggunakan suhu ruangan dengan

suhu 25°C dan kelembapan 70%, dan dilanjutkan desikasi di LAF, serta silika gel secara berurutan. Embrio yang sudah didehidrasi kemudian dimasukkan dalam *propylene cryovial* dan segera disimpan dalam nitrogen cair (-196°C). Percobaan ini dilakukan selama 16 jam dan setelah itu dilakukan proses thawing pada suhu 40°C selama 1 menit, kemudian diuji daya tumbuhnya secara *in vitro*. Pada metode ini, kadar air benih sangat menentukan keberhasilan perkecambahan pasca penyimpanan dengan teknik kriopreservasi. Kadar air embrio antara 10%-20% menghasilkan perkecambahan yang lebih baik.

Penelitian terbaru mengenai kriopreservasi embrio zigotik kelapa sawit dilakukan oleh Prakash et al. (2019) yang menggunakan metode kriopreservasi klasik dan baru dengan membandingkan beberapa metode yang berbeda, diantaranya *air desiccation*, *encapsulation-dehydration*, dan *vitrification*. Metode *air desiccation* pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan desikasi embrio pada LAF selama 6 jam, kemudian embrio dimasukkan dalam *cryo-vial* dan dilakukan pembekuan cepat dan langsung dimasukkan dalam nitrogen cair. Metode *encapsulation-dehydration* menggunakan gel alginat yang dibuat dari media dasar MS dengan 3% Na-alginat. Sebelum disimpan, bulatan gel alginat berisi embrio diinkubasi selama 15 menit pada suhu 25°C, kemudian dimasukkan dalam media dasar MS dengan tambahan sukrosa 0,3-0,75 M dalam tabung erlemeyer kemudian di-*shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 24 jam. Kemudian didehidrasi dalam LAF kembali selama 6 jam, lalu dimasukkan dalam 1 ml *cryo-vial* dan dilakukan pembekuan cepat dalam nitrogen cair. Pada metode vitrifikasi, embrio di *pre-culture* pada media MS dasar dengan 1,2 M sukrosa selama 3 hari. Setelah itu, embrio dimasukkan dalam 1 ml *cryo-vial* dan diperlakukan dengan *loading solution* (0,4 M sukrosa dan 2 M gliserol dalam media MS dasar) selama 20 menit pada suhu 25°C, setelah itu larutan diganti dengan PVS2. Tahapan selanjutnya adalah pembekuan cepat pada nitrogen cair. Setelah penyimpanan, *thawing* ketiga metode dilakukan dengan merendam embrio dalam suhu 38°C selama 2-5 menit dan ditumbuhkan kembali menggunakan media dasar MS.

2. Kriopreservasi Suspensi Sel

Kriopreservasi suspensi sel embriogenik kelapa sawit dilakukan menggunakan krioprotektan selama 1 jam pada suhu 0 derajat dengan 1,0 M glukosa dan 10% DMSO, yang disimpan dalam 0,5°C hingga -40°C, kemudian direndam dalam nitrogen cair. Viabilitas embrio setelah penyimpanan dengan kriopreservasi adalah 20-45% berdasarkan uji viabilitas menggunakan uji tetrazolium dan mampu tumbuh dengan baik pada media MS semi-padat maupun cair (da Silva dan Engelmann, 2017).

3. Kriopreservasi Kalus

Kriopreservasi kalus kelapa sawit menggunakan vitrifikasi dilaporkan oleh Khawnium dan Te-Chato (2011). Bahan berupa kalus embriogenik yang friabel perlu dilakukan *preconditioning* selama 7 hari dalam media yang mengandung 0,25 M sukrosa. Setelah itu dilakukan dehidrasi menggunakan larutan PVS2 selama 60 menit pada suhu 0°C dan segera di masukkan dalam nitrogen cair. Proses *thawing* atau pelelehan kembali dilakukan dengan merendam kalus embriogenik dalam suhu 40°C selama 2 menit. Setelah itu, kalus embriogenik ditanam dalam media yang mengandung 0,1 mg/l dicamba dan 3% sukrosa. Persentase keberhasilan kalus embriogenik membentuk embrio somatik mencapai 66% menggunakan metode ini (Khawnium dan Te-Chato, 2011).

4. Kriopreservasi Embrio Somatik

Kriopreservasi embrio somatik kelapa sawit pertama kali dilakukan menggunakan metode kriopreservasi klasik (Engelmann et al., 1985). Dalam perkembangannya, kriopreservasi embrio somatik kelapa sawit menggunakan metode *droplet-vitrifikasi* dipublikasikan oleh Gantait et al. (2014), dan *encapsulation-desiccation* oleh Palanyandy et al. (2020).

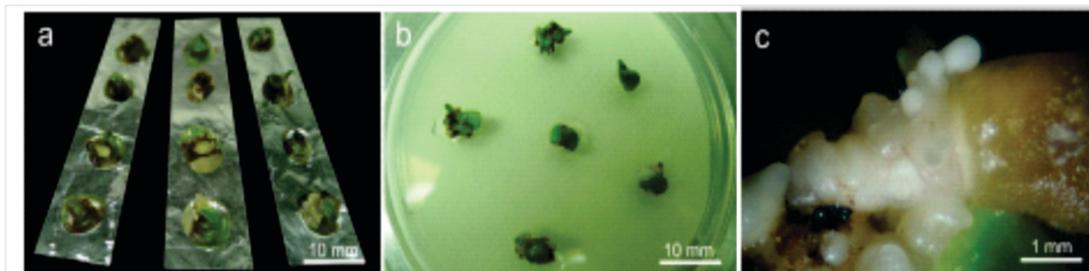
Pada tahap persiapan bahan yang akan disimpan yaitu embrio somatik ditanam dalam kultur *in vitro* menggunakan media MS (Murashige dan Skoog, 1962) dengan tambahan 0,75 M sukrosa. Embrio somatik yang digunakan berbentuk torpedo dan berwarna putih berkilau. Embrio somatik dimasukkan dalam 2 ml *cryotubes* steril dan segera direndam

dalam nitrogen cair dan dilakukan penyimpanan. Setelah penyimpanan, *cryotubes* dimasukkan dalam *water bath* 40°C selama 1 menit. Penumbuhan kembali dilakukan dengan media MS dengan tambahan 0,3 M sukrosa dan 2,4-D selama 1 minggu, dilanjutkan dengan media MS dengan tambahan 0,1 M sukrosa dan 2,4-D selama 2 minggu. Setelah itu, embrio somatik dipindahkan pada media dasar tanpa zat pengatur tumbuh. Persentase keberhasilan pertumbuhan kembali berkisar antara 31%-55% (Engelmann et al., 1985 cit. da Silva dan Engelmann, 2017).

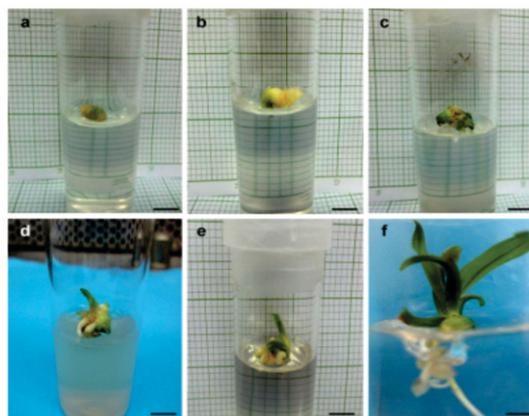
Metode droplet-vitrifikasi menggunakan osmoprotektan berupa loading solution (LS) kemudian dilakukan dehidrasi dalam bentuk bulatan-bulatan beku atau chilled droplet 100 µl PVS2 (Gambar 2a), ditempatkan pada strip aluminium yang steril. Kemudian embrio dengan cepat dimasukkan dalam 2 ml cryovial, setelah itu dimasukkan dalam nitrogen cair. Setelah disimpan, embrio mampu beregenerasi

kembali dengan baik (Gambar 2b dan 2c) (Gantait et al., 2014).

Kriopreservasi embrio kelapa sawit dengan metode *encapsulation-desiccation* oleh Palanyandy et al. (2020) dilakukan dengan melapisi embrio menggunakan gel alginat. Embrio somatik kelapa sawit dicelupkan dalam media MS cair tanpa Ca dengan tambahan natrium alginat 3%. Embrio somatik yang sudah dilapisi gel alginat kemudian di masukkan perlahan ke dalam larutan 100 mM CaCl₂, sehingga embrio terlapisi dengan gel alginat dan CaCl₂. Setelah itu dibiarkan dalam larutan CaCl selama 20-30 menit. Kemudian butiran embrio yang telah terlapisi diletakkan pada kertas filter, kemudian dilakukan pengeringan pada LAF. Setelah itu, embrio dimasukkan dalam 1 ml cryotube polypropylene dan direndam dalam nitrogen cair. Thawing dilakukan dalam suhu 40°C selama 2-3 menit dan ditumbuhkan kembali pada media hingga menghasilkan planlet (Gambar 3).



Gambar 2. Kondisi embrio pada proses kriopreservasi kelapa sawit menggunakan metode *droplet* vitrifikasi dan regenerasi setelah penyimpanan. a) embrio dalam *droplet*; b) keberhasilan *thawing* setelah penyimpanan; c) regenerasi dan perkembangan embrio setelah 4 minggu kultur dalam media MS. Sumber: Gantait et al. (2014).



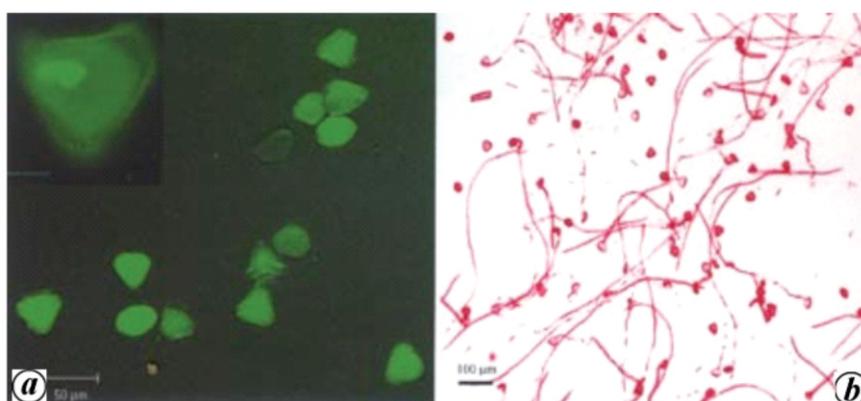
Gambar 3. Keberhasilan pertumbuhan kembali kultur kelapa sawit yang disimpan dengan kriopreservasi. a) Embrio somatik setelah disimpan secara kriopreservasi dalam nitrogen cair, b-d) Embrio somatik mulai mengembang dan respon terhadap media MS dengan kandungan gula dan 0,2 mg/l 2,4-D, e-f) Pembentukan tunas dan akar serta pembentukan planlet lengkap setelah 8 minggu kultur. Sumber: Palanyandy et al. (2020)

5. Kriopreservasi Polen

Kriopreservasi polen dilakukan pada suhu -15°C dengan tahapan diantaranya polen yang murni dikeringkan dengan oven pada suhu 37°C selama 6 jam, setelah itu disimpan dalam pendingin suhu -15°C . Setelah 12 bulan penyimpanan, viabilitas polen tidak berbeda dengan polen tanpa penyimpanan pada suhu rendah, yaitu hampir 100% (Ekaratne, 1983). Penelitian lain yang dilaporkan oleh Tandon et al. (2007), menggunakan metode yang lebih sederhana yaitu polen dikeringanginkan selama 1 jam kemudian

diturunkan kadar airnya hingga kadar air 23% menunjukkan bahwa setelah 8 tahun penyimpanan menggunakan kriopreservasi, polen mampu berkecambah dengan baik (Gambar 4).

Pada komoditas kelapa sawit, tidak banyak ditemukan publikasi lainnya mengenai penyimpanan polen menggunakan kriopreservasi. Publikasi penyimpanan polen menggunakan kriopreservasi pada komoditas palmae lainnya diantaranya telah diaplikasikan untuk kurma (Anushma et al., 2018) dan kelapa (Machado et al., 2014).



Gambar 4. a) Kondisi polen setelah disimpan dalam kriopreservasi selama 8 tahun; b) Perkecambahan polen yang menunjukkan viabilitas yang tetap tinggi setelah penyimpanan dalam kriopreservasi. Sumber: Tandon et al. (2007)

Recovery dan Pengujian Lapangan Pasca Penyimpanan dalam Kriopreservasi

Da Silva dan Engelmann (2017), menyatakan bahwa embrio somatik dari 39 klon kelapa sawit yang dikriopreservasi selama 15 bulan menggunakan protokol Engelmann et al., (1985) menunjukkan pertumbuhan kembali bahan setelah disimpan dalam kriopreservasi berkisar antara 10-20%, dan setelah diuji di lapangan menunjukkan tidak ada perbedaan pertumbuhan vegetatif dan generatif dibandingkan dengan yang tidak disimpan dalam kriopreservasi. Keberhasilan pertumbuhan kembali setelah kriopreservasi adalah 2-100%. Kemudian dilakukan pengujian lapangan terhadap 440 tanaman yang berasal dari bahan yang disimpan dengan kriopreservasi. Pengujian dilakukan selama 12 tahun untuk diamati pertumbuhan vegetatif dan pembungaannya. Hasil yang diperoleh terdapat keterlambatan pembungaan

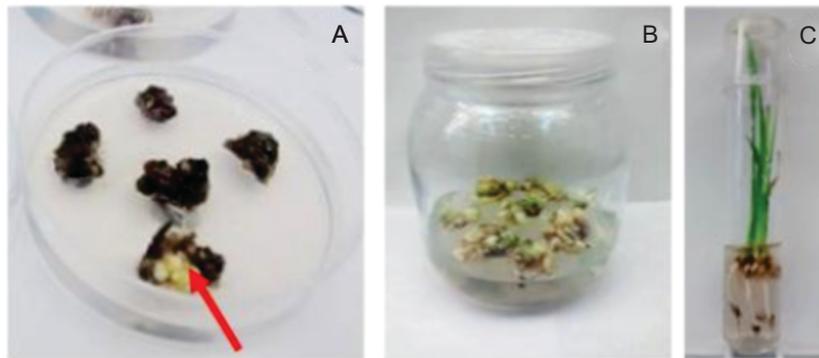
pada awal pertumbuhan tanaman pada bahan yang disimpan dengan kriopreservasi, karena pada waktu pengamatan yang sama, pembungaan klon yang tidak disimpan dalam kriopreservasi telah mencapai 61% dan yang disimpan dengan kriopreservasi masih 34% yang berbunga. Namun, setelah 3 tahun penanaman, semua klon baik yang disimpan dengan kriopreservasi maupun tanpa penyimpanan dengan kriopreservasi telah berbunga seluruhnya dan menghasilkan bunga serta pertumbuhan vegetatif yang normal (Da Silva dan Engelmann, 2017).

Hasil penelitian terbaru mengenai pertumbuhan kembali 29 klon kelapa sawit yang telah dikriopreservasi selama 20 tahun di IRD Montpellier, Perancis, mampu menghasilkan pertumbuhan kembali yang baik dan tidak berbeda nyata dengan yang disimpan dalam kriopreservasi selama 1 tahun. Visualisasi embrio somatik setelah disimpan dalam kriopreservasi selama 20 tahun menunjukkan bahwa embrio berwarna hitam, namun setelah ditumbuhkan

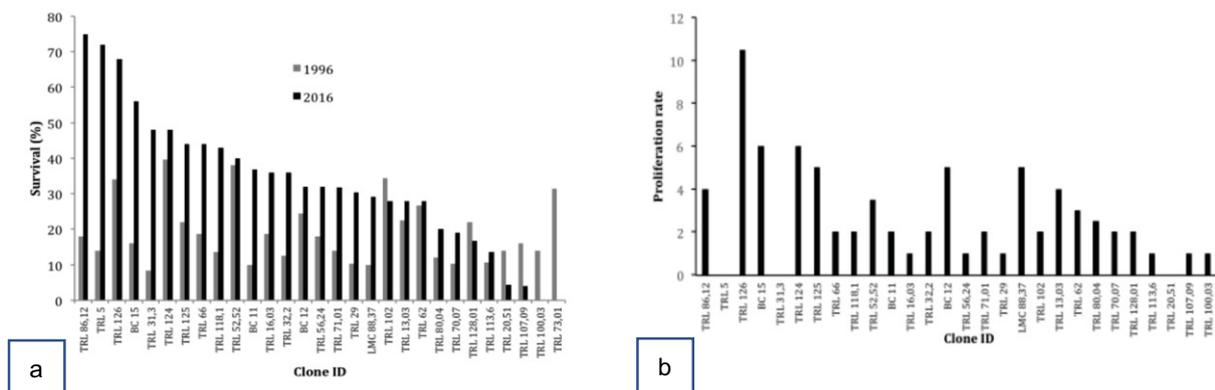
kembali pulih menjadi embrio somatik berwarna putih (Gambar 5a). Selain itu rerata proliferasi klon setelah disimpan dalam kriopreservasi selama 20 tahun, masih cukup baik dan mampu tumbuh hingga menjadi planlet (Gambar 5b-c dan Gambar 6). Oleh karena itu, disimpulkan bahwa penyimpanan bahan kelapa sawit menggunakan kriopreservasi tidak mengalami perubahan genetik, sehingga stabilitas bahan yang disimpan terjamin (Beule et al. 2018).

Sebagai pembanding, pada kurma juga tidak menyebabkan perbedaan genetik dari planlet hasil regenerasi embrio yang telah disimpan dalam kriopreservasi. Perbandingan antara tanaman induk

dengan planlet hasil regenerasi tersebut menunjukkan polimorfisme yang sangat rendah dan homogenitas dapat dipertahankan setelah penyimpanan dengan kriopreservasi (Al-Qurainy et al., 2017). Namun, pada komoditas kakao penyimpanan embrio somatik menggunakan kriopreservasi dapat menyebabkan metilasi pasca penyimpanan. Hal ini dijelaskan dengan adanya penggunaan krioprotektan. Selain itu, perubahan urutan DNA dapat terjadi karena adanya kondisi stress cekaman osmotik yang tinggi dan penggunaan sukrosa konsentrasi tinggi selama vitrifikasi (Adu-Gyamfi et al., 2016).



Gambar 5. Pertumbuhan kembali embrio somatik kelapa sawit setelah penyimpanan dalam kriopreservasi. a) Embrio somatik yang berhasil hidup setelah kriopreservasi; b) Perbanyakkan embrio somatik; c) Planlet yang dihasilkan dari kriopreservasi embrio somatik. Sumber: Beule et al. (2018).



Gambar 6 a) Perbandingan keberhasilan pertumbuhan kembali 29 klon kelapa sawit sebelum disimpan menggunakan kriopreservasi dan yang telah disimpan menggunakan kriopreservasi selama 20 tahun. b) Rerata proliferasi klon setelah penyimpanan dalam kriopreservasi dan telah ditumbuhkan kembali dalam media MS selama 4 bulan. Sumber: Beule et al. (2018).

KESIMPULAN

Kriopreservasi merupakan salah satu cara penyimpanan sumber daya genetik jangka panjang dalam nitrogen cair (-196°C). Penyimpanan sumber daya genetik kelapa sawit dalam kriopreservasi dapat mencapai hingga 20 tahun tanpa adanya perubahan genetik setelah bahan yang disimpan ditumbuhkan kembali. Bahan kriopreservasi kelapa sawit yang paling efektif adalah embrio somatik, meskipun bahan lainnya seperti embrio zigotik, polen, dan suspensi sel juga berhasil. Metode kriopreservasi yang dapat digunakan untuk kelapa sawit adalah metode kriopreservasi klasik dan baru.

DAFTAR PUSTAKA

- Adu-Gyamfi, R., A. Wetten, C.M.R. Lopez. (2016). Effect of Cryopreservation and Post-Cryopreservation Somatik Embryogenesis on the Epigenetic Fidelity of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Plos One* July(12):1-13.
- Al-Qurainy, F., S. Khan, M. Nadeem, M. Tarroum, S. Alansi, A.A. AL-Ameri, A.R.Z. Gaafar, A. Alshameri. (2017). Assessing genetic fidelity in regenerated plantlets of date palm cultivars after cryopreservation. *Fresenius Environmental Bulletin* 26(2):1727-1735.
- Anushma, P.L., L. Vincent, P.E. Rajesekharan, dan S. Ganeshan. (2018). Pollen storage studies in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Chemical Studies* 6(5):2640-2642.
- Beule, T., P. Ilbert, K. Adeotu, T. Durand-Gasselin, D. Dumet, F. Engelmann, dan F. Morcillo. (2018). Recovery of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatik embryo cryostored for 20 years. *Cryo Letters* 39(1):60-66.
- Da Silva, J.A.T. dan F. Engelmann. (2017). Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Cryobiology* (2017):1-20.
- Ekaratne, S.N.R., dan S. Senathirajah. (1983). Viability and storage of pollen of the oil palm, *Elaeis guineensis* Jacq. *Ann. Bot.* 51(1983):661-668.
- Engelmann, F., Y. Duval, dan J. Dereuddre. (1985). Survival and proliferation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatik embryos after freezing in liquid nitrogen, CR. *Acad. Sci. Paris* 301, *Série III* (1985):111–364.
- Funnekotter, B., E. Bunn, dan R. L., Mancera. (2017). Cryo-mesh: A simple alternative cryopreservation protocol. *Cryo Letters* 38(2):155-159.
- Gantait, S., U.R. Sinniah, P. Suranthran., S.R. Palanyandy, dan S. Subramaniam. 2014. Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity *Protoplasma* 252(1):89-101.
- Gantait, S., Sinniah, U. R., Suranthran, P., Palanyandy, S. R., & Subramaniam, S. (2014). Improved cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids using droplet vitrification approach and assessment of genetic fidelity. *Protoplasma*, 252(1): 89–101.
- Gantait, S., U.R. Sinniah, G. Shukla, dan N.C. Sahu. 2017. Cryoconservation Methods for Extended sStorage of Plant Genetic Resources, Chapter 25. *Plant Biodiversity: Monitoring, Assessment and Conservation*. CABI International, Boston.
- Grout, B.W.W., K. Shelton, dan H.W. Pritchard. (1983). Orthodox behaviour of oil palm seed and cryopreservation of the excised embryo for genetic conservation. *Ann. Bot.* 52(1983):381-384.
- Jiroutova, P., dan J. Sedlak. (2020). Cryobiotechnology of Plants: A Hot Topic Not Only for Gene Banks. *Apply Sci.* 10(4677):2-14.
- Kaczmarczyk, A., B. Funnekotter, A. Menon, P.Y. Phang, A. Al-Hanbali, E. Bunn, dan R.L. Mancera. (2012). Current Issue in Plant Cryopreservation. *Current Frontiers in Cryobiology*. <https://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/current-issues-in-plant-cryopreservation>. Diakses 27 Desember 2020
- Khawnium, T. dan S. Te-chato. (2011). Simple vitrification protocol for cryopreservation of oil palm using embryogenic culture. *Journal of Agricultural Technology* 7(2): 519-529.
- Leunufna, S. (2019). Kriopreservasi untuk konservasi sumber daya genetik tanaman: peluang pemanfaatannya di Indonesia. *Jurnal AgroBiogen* 3(2):80-88.

- Machado, C.A., C.R.F. Moura., E.E.P de Lemos, S.R.R. Ramos, dan F.E. Rebeiro, dan A.S. Ledo. (2014). Pollen grain viability of coconut accessions at low temperature. *Acta Scientiarum. Maringa* 36(2):227-232.
- Norziha, A., M. Marhalil, A.M. Fadila, Y. Zulkifli, I. Maizura, A.m. Din, N. Rajanaidu, dan A. Kushairi. (2017). Long-term Storage of oil palm germplasm zygotic embryo using cryopreservation. *Journal of Oil Palm Research* 29(4):541-547.
- Palanyandy, S.R., S. Gantait., S. Subramanlam, dan U.R. Sinniah. (2020). Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) polyembryoids via encapsulation-desiccation. *3 Biotech* (2020)10.9:1-10.
- Prakash, K., K.S. Kumar., dan R. Chaudhury. (2019). Cryopreservation of kernel and zygotic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Journal of Plantation Crops* 47(1):16-23.
- Rajanaidu, N dan M.M. Ainul. (2013). Chapter 10: Conservation of oil palm and coconur genetic resources. *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer Science and Business Media, New York.
- Reed, B.M. (2011). Choosing and applying cryopreservation protocols to new plant species or tissues. *Acta Horticulturae* 908:363-372.
- Tandon, R., R. Chaudhury, dan K.R. Shivanna. (2007). Cryopreservation of oil palm pollen. *Current Science* 92(2):182-183.