

Teknik Enkapsulasi Sederhana untuk Konservasi *In vitro* Jangka Menengah Tanaman Nenas (*Ananas comosus*) [Simple Encapsulation Technique for Medium Term Pineapple (*Ananas comosus*) *In vitro* Conservation]

Riry Prihatini dan Sri Hadiati

Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, Jln. Raya Solok-Aripan km.8, Solok, Sumatera Barat, Indonesia 27301
E-mail: riry_silva@yahoo.com

Diterima: 24 Agustus 2018; direvisi: 14 Desember 2018; disetujui: 12 April 2019

ABSTRAK. Konservasi *in vitro* tanaman nenas dilakukan untuk penyimpanan materi genetik sebelum dimanfaatkan. Penelitian ini dilaksanakan untuk mengembangkan teknik enkapsulasi yang dapat memperpanjang daya simpan benih sintetik nenas melalui perlakuan konsentrasi natrium alginat, suhu, dan media penyimpanan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika, mulai Januari hingga Desember 2017. Bahan yang digunakan adalah *plantlet* nenas aksesori 5X18(10). Penelitian dibagi menjadi dua subkegiatan. Metode yang digunakan pada subkegiatan pertama yaitu tunas mikro nenas dienkapsulasi dengan metode tetes menggunakan natrium alginat 3% dan 4% serta penyimpanan dalam akuades steril dan tanpa media selama 30, 60, 120, dan 240 hari pada suhu 25°C. Penggunaan 4% natrium alginat dan media akuades steril dapat memperpanjang masa simpan benih sintetik nenas hingga 240 hari dengan daya regenerasi benih 100%. Pada subkegiatan kedua, perlakuan terbaik pada subkegiatan pertama dilanjutkan dengan perlakuan suhu penyimpanan 4°C. Benih sintetik nenas pada suhu penyimpanan tersebut hanya mampu bertahan hingga 60 hari, selebihnya tunas dalam benih menghitam dan tidak dapat ditumbuhkan kembali. Metode enkapsulasi untuk penyimpanan materi genetik yang dikembangkan dalam penelitian ini lebih sederhana dan efisien serta dapat diaplikasikan pada kegiatan konservasi *in vitro* jangka menengah tanaman nenas.

Kata kunci: Enkapsulasi; Konservasi; *In vitro*; Tanaman nenas

ABSTRACT. *In vitro* conservation of pineapple was conducted as preservation of genetic material before it was further utilized. This research was conducted to obtain encapsulation technique which expanded synthetic seeds shelf life by modifying concentration of sodium alginate, incubation media, and temperature. The research was conducted on Tissue Culture Laboratory of Indonesian Tropical Fruit Research Institute on January to December 2017. The materials which were used included pineapple micro shoots accessions 5X18(10). The research was divided into subactivities. The method which was applied on the first subactivity included encapsulation of pineapple micro shoots using drop method with sodium alginate 3% and 4%, incubation media sterile aquades and without media for 30, 60, 120, and 240 days on 25°C temperature. The use of 4% sodium alginate and sterile aquades incubation media prolonged the pineapple shelf life up to 240 days with 100% regeneration capability. On the second subactivity, the best treatment on the first activity was combined with 4°C incubation temperature. The pineapple synthetic seeds on this incubation temperature only survive up to 60 days, became blackening, and could not be regrowth. Encapsulation method which was developed on this study was simpler, more efficient, and able to be applied for medium term pineapple *in vitro* conservation.

Keywords: Encapsulation; Conservation; *In vitro*; Pineapple plants

Tanaman nenas (*Ananas comosus*) merupakan salah satu tanaman penting hortikultura yang banyak berkontribusi pada nilai ekspor buah-buahan Indonesia secara keseluruhan. Indonesia menduduki peringkat ketiga negara ASEAN pengekspor nenas, setelah Filipina dan Thailand. Berdasarkan data tahun 2015, Indonesia mampu memproduksi 1.729.600 ton nenas dari luas panen 14.694 Ha (Subdirektorat Statistik Hortikultura 2016). Untuk meningkatkan nilai ekspor komoditas ini, perlu dilakukan beberapa upaya, di antaranya adalah pemuliaan tanaman nenas untuk mendapatkan varietas unggul baru. Balitbu Tropika telah melaksanakan kegiatan pemuliaan nenas sejak tahun 2000-an dan telah menghasilkan banyak aksesori nenas unggulan. Aksesori nenas unggulan tersebut perlu dikonservasi sebelum dilakukan penelitian mendalam

untuk tujuan pelepasan varietas, misalnya mengenai teknik perbanyakan klonal *true-to-type*.

Perkembangan bioteknologi di bidang kultur *in vitro* tumbuhan menghasilkan beberapa teknik penting yang memfasilitasi konservasi dan pengelolaan sumber daya genetik, di antaranya adalah teknik enkapsulasi. Teknik enkapsulasi adalah metode pembalutan bagian tanaman *in vitro* dengan lapisan agar sehingga bersifat menyerupai benih yang dapat ditanam kembali dan tumbuh menjadi *plantlet in vitro*, setelah jangka waktu tertentu. Teknik enkapsulasi dinilai lebih sederhana pengerjaannya serta tidak membutuhkan fasilitas yang terlalu canggih daripada teknik konservasi *in vitro* lainnya, seperti kriopreservasi (Standardi & Universit 2012). Teknik enkapsulasi telah dikembangkan pada tanaman *Citrus* (Singh *et al.* 2007), *Actinidia*,

Diospyros, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus*, *Vitis* (Benelli, Carlo & Engelmann 2013), dan *Brassica napus* (Zeynali *et al.* 2013), *Withania coagulans* (Rathore & Kheni 2017), anggrek *Ansellia africana* (Bhattacharyya, Kumar & Van Staden 2018), dan *Capparis decidua* (Siddique & Bukhari 2018).

Kultur jaringan tanaman nenas telah banyak dikembangkan untuk tujuan mikropropagasi (Bartholomew *et al.* 2018) karena tanaman ini relatif sulit diperbanyak secara vegetatif konvensional (Parveen *et al.* 2019). Selain itu, kultur jaringan nenas juga dilakukan untuk studi karakter selular, fisiologi, dan biokimia tanaman nenas (Halim *et al.* 2018), ekspresi gen dan interaksi protein (Priyadarshani *et al.* 2018). Konservasi *in vitro* tanaman nenas dapat dilakukan dengan teknik kriopreservasi antara lain untuk tujuan konservasi jangka panjang dan pengendalian mikroorganisme pengganggu (Roostika 2017). Selain itu, konservasi *in vitro* tanaman nenas juga dapat dilakukan dengan teknik enkapsulasi, yaitu dengan pengaplikasian teknik butiran alginat sebagai metode penyimpanan jangka pendek dalam program transformasi (Gangopadhyay & Mukherjee 2005). Tunas yang digunakan pada proses enkapsulasi nenas berasal dari eksplan tunas aksilar (Soneji, Rao & Mhatre 2002) maupun tunas apikal (Gámez-Pastrana *et al.* 2004) atau somatik embrio dengan waktu penyimpanan hingga 28 hari (Roostika *et al.* 2012).

Beberapa hal yang memengaruhi keberhasilan teknik enkapsulasi adalah media yang digunakan, jenis, dan konsentrasi agen pemat, suhu, serta media penyimpanan (Standardi & Universitas 2012).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan metode enkapsulasi tanaman nenas yang dapat memperpanjang masa simpan benih sintetik. Penelitian dilakukan dengan mengetahui pengaruh konsentrasi natrium alginat sebagai agen pemat, suhu, dan media penyimpanan terhadap daya tumbuh benih sintetik aksesori nenas koleksi Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika. Hipotesis penelitian adalah penggunaan 4% natrium alginat, media penyimpanan akuades steril, dan suhu penyimpanan 25°C dapat memperpanjang masa penyimpanan benih sintetik nenas hingga 240 hari.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Kebun Percobaan Arian, Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika dari Januari hingga Desember 2017.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *plantlet* (tanaman hasil perbanyakan kultur jaringan yang belum diaklimatisasi) nenas aksesori 5X18(10) yang merupakan koleksi Balai Penelitian Tanaman Buah Tropika. Aksesori 5X18(10) adalah aksesori No. 10 hasil persilangan antara nenas Cayenne x Queen. Aksesori yang digunakan dalam penelitian merupakan materi hasil persilangan yang akan digunakan pada kegiatan penelitian selanjutnya. *Plantlet* nenas aksesori tersebut digunakan sebagai *starter* untuk induksi tunas mikro nenas pada media MS + 2 mg/l BAP (Atawia *et al.* 2013). Kultur diinkubasi pada suhu 25 ± 1°C, 8 jam fotoperiodisitas dengan intensitas cahaya 800-1.000 Lux.

Metode Penelitian

Pengaruh Konsentrasi Natrium Alginat, Media Penyimpanan, dan Periode Penyimpanan Terhadap Daya Regenerasi Benih Sintetik Nenas

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan, yaitu konsentrasi natrium alginat, media penyimpanan, dan lama penyimpanan. Perlakuan konsentrasi natrium alginat terdiri atas dua taraf, yaitu 3% (K1) dan 4% (K2), perlakuan media penyimpan terdiri atas dua taraf, yaitu dengan akuades steril (M1) dan tanpa media (M2), serta perlakuan lama penyimpanan terdiri atas empat taraf, yaitu 30 hari (L1), 60 hari (L2), 120 hari (L3), dan 240 hari (L4). Jadi, percobaan terdiri atas 16 kombinasi perlakuan, yaitu K1M1L1, K1M1L2, K1M1L3, K1M1L4, K1M2L1, K1M2L2, K1M2L3, K1M2L4, K2M1L1, K2M1L2, K2M1L3, K2M1L4, K2M2L1, K2M2L2, K2M2L3, dan K2M2L4. Setiap kombinasi perlakuan terdiri atas 10 benih sintetik dan diulang sebanyak tiga kali.

Benih sintetik nenas diperoleh dengan cara mengisolasi tunas mikro nenas berukuran 5 mm pada lingkungan steril dan selanjutnya dicelupkan dalam larutan pemat natrium alginat, 3% dan 4% pada media ½ MS0 cair. Selanjutnya tunas mikro dicelupkan dalam larutan *complexing* CaCl₂ 2% selama 30 detik atau hingga terbentuk kapsul benih.

Kapsul benih sintetik disimpan pada media penyimpanan akuades steril dan suhu penyimpanan 25°C selama 30, 60, 120, dan 240 hari untuk mengetahui efektivitas penggunaan natrium alginat sebagai bahan pembalut benih sintetik nenas dan media penyimpanan benih sintetik yang dapat mempertahankan daya tumbuh benih. Setelah periode penyimpanan, benih sintetik ditumbuhkan kembali pada media MS + 2 mg/l BAP.

Pengaruh Suhu dan Periode Penyimpanan Terhadap Daya Tumbuh Benih Sintetik Nenas

Perlakuan konsentrasi natrium alginat dan media penyimpanan terbaik pada subkegiatan sebelumnya digunakan untuk subkegiatan kedua dengan penambahan perlakuan suhu penyimpanan.

Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan dua perlakuan, yaitu suhu penyimpanan dan lama penyimpanan. Perlakuan suhu penyimpanan terdiri atas dua taraf, yaitu 4°C (S1) dan 25°C (S2), dan perlakuan lama penyimpanan terdiri atas empat taraf, yaitu 30 hari (L1), 60 hari (L2), 120 hari (L3), dan 240 hari (L4). Jadi, percobaan terdiri atas delapan kombinasi perlakuan, yaitu S1L1, S1L2, S1L3, S1L4, S2L1, S2L2, S2L3, dan S2L4. Setiap kombinasi perlakuan terdiri atas 10 benih sintetik dan diulang sebanyak tiga kali.

Benih sintetik nenas dihasilkan sesuai dengan prosedur tetes seperti pada subkegiatan pertama.

Untuk masing-masing subkegiatan, parameter yang diamati adalah persentase *browning*, kontaminasi, warna tunas di dalam kapsul, daya regenerasi benih sintetik, yaitu persentase eksplan nenas yang hidup setelah kapsul berisi eksplan ditanam kembali ke media MS + 2 mg/l BAP pada masing-masing waktu penyimpanan, serta hari pertama benih sintetik tumbuh tunas setelah benih disubkultur pada media pertumbuhan.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam (Anova), untuk membedakan antarperlakuan dilakukan dengan uji Duncan pada taraf selang kepercayaan $p = 0,05\%$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Selain untuk tujuan penyimpanan, teknik enkapsulasi juga memiliki tujuan perlindungan *plantlet* dari kontaminasi. Pertumbuhan minimal dapat mengurangi subkultur sehingga dapat mengurangi risiko induksi variasi somaklonal akibat frekuensi subkultur yang tinggi.

Teknik enkapsulasi tanaman umumnya menggunakan zat penghambat pertumbuhan atau retardan, misalnya paklobutrazol dan manitol. Khusus tanaman nenas, teknik enkapsulasi yang telah dikembangkan sebelumnya dapat menghambat pertumbuhan hingga 28 hari dengan pengaplikasian paklobutrazol dan manitol (Roostika *et al.* 2012). Penggunaan paklobutrazol dalam kegiatan konservasi

in vitro dilakukan karena dapat menghambat pertumbuhan tanaman *in vitro* (Indrayanti *et al.* 2018). Selain itu, paklobutrazol dapat menyebabkan efek negatif seperti tanaman menjadi kerdil, menghambat penyerapan nutrisi, dan menyebabkan perubahan morfologi akar (Kishore, Singh & Kurian 2015).

Metode enkapsulasi yang dikembangkan dalam penelitian ini mengoptimalkan konsentrasi natrium alginat sebagai matriks pembalut, media, dan suhu penyimpanan kapsul benih sintetik tanpa menggunakan zat retardan.

Pengaruh Konsentrasi Natrium Alginat dan Media Penyimpanan Terhadap Regenerasi Benih Sintetik Nenas

Alginat adalah biomaterial yang banyak diaplikasikan pada bidang biomedik dan biosains karena sifatnya, seperti biokompabilitas dengan material lain dan kemudahannya menggumpal (Yong & Mooney 2012). Penggunaan natrium alginat banyak diaplikasikan pada pembuatan benih sintetik tanaman, terutama pada tanaman obat, misalnya *Rauwolfia serpentina* (Gantait *et al.* 2017), *Ledebouria revoluta* (Haque & Ghosh 2016), dan *Withania coagulans* (Alatar *et al.* 2017).

Pada penelitian ini, benih sintetik yang telah dibentuk dengan menggunakan 3% dan 4% natrium alginat, diinkubasi dalam media penyimpanan akuades steril dan tanpa media. Benih sintetik selanjutnya diinkubasi pada suhu 25°C selama periode penyimpanan 30, 60, 120, dan 240 hari. Hasil dari pengaruh konsentrasi natrium alginat, media, dan periode penyimpanan terhadap daya regenerasi benih sintetik nenas disajikan pada Tabel 1.

Parameter hari pertama tumbuh tunas ditentukan pada hari keberapa tunas dalam benih sintetik menembus matriks pembalut setelah benih sintetik disubkultur ke media pertumbuhan. Secara umum, pada benih yang dienkapsulasi baik dengan natrium alginat 3% maupun 4%, tunas dapat menembus matriks natrium alginat mulai hari ke-10. Lebih lanjut, pada benih sintetik yang dibalut dengan natrium alginat 4% dan penyimpanan dalam akuades steril selama 120 dan 240 hari, tunas membutuhkan waktu yang lebih lama untuk dapat menembus matriks natrium alginat, yaitu hingga hari ke-21 setelah subkultur. Hal tersebut disebabkan karena matriks natrium alginat 4% membentuk lapisan pembalut tunas yang lebih kompak sehingga tunas membutuhkan waktu yang lebih panjang untuk dapat menembusnya.

Pada Tabel 1 terlihat bahwa semua benih sintetik baik yang dienkapsulasi dengan natrium alginat 3% dan 4% yang diinkubasi dalam akuades steril selama 30 dan

60 hari dapat tumbuh dengan baik setelah disubkultur pada media pertumbuhan. Namun demikian, benih sintetik nenas yang dibalut dengan natrium alginat 3% hanya dapat bertahan hingga 60 hari karena tunas mikro di dalam kapsul menembus lapisan pembalut. Pada kombinasi perlakuan dengan natrium alginat 3%, semua benih sintetik pada hari ke-60 pengamatan sudah tumbuh menjadi *plantlet* dan tidak lagi berbentuk benih sintetik sehingga pengamatan untuk periode penyimpanan 120 dan 240 hari tidak dapat dilakukan.

Pada banyak penelitian enkapsulasi tanaman, natrium alginat 3% banyak diaplikasikan. Benih sintetik tanaman *L. revoluta* yang diinkubasi pada suhu 15°C selama 180 hari memiliki tingkat *germinasi* hingga 57,8%. Tanaman tersebut memiliki profil genetik yang serupa dengan tanaman induknya berdasarkan analisis molekular dengan penanda RAPD dan mampu menghasilkan bunga setelah ditanam di lapang pada 14 bulan setelah tanam (Haque & Ghosh 2016). Enkapsulasi dengan 3% natrium alginat dan 100 mM CaCl₂ adalah kombinasi terbaik dalam proses enkapsulasi tanaman *Withania coagulans* dengan

tingkat kapasitas regenerasi hingga 96% (Rathore & Kheni 2017).

Penggunaan matriks natrium alginat 3% pada kegiatan enkapsulasi benih sintetik nenas telah dilakukan. Penggunaan matriks natrium alginat 3% pada media MS0 dalam berbagai media penyimpanan media MS0 cair dengan penambahan kinetin hanya dapat mempertahankan viabilitas tunas hingga 45 hari (Soneji, Rao & Mhatre 2002). Penelitian Gangopadhyay *et al.* (2005) yang menggunakan natrium alginat 3%, benih sintetik nenas yang berhasil tumbuh setelah 45 hari penyimpanan memiliki profil genetik yang serupa dengan tanaman sumber eksplan berdasarkan analisis molekular dengan marka RAPD dan ISSR. Demikian halnya dengan penggunaan natrium alginat 3% pada enkapsulasi batang semu dan basal daun dapat mempertahankan viabilitas benih hanya selama 28 hari (Roostika *et al.* 2012).

Pada penelitian enkapsulasi nenas ini, benih sintetik yang dibalut dengan matriks alginat 3% dapat bertahan lebih lama, yaitu hingga 60 hari dengan persentase *browning* dan daya regenerasi berturut-turut

Tabel 1. Daya regenerasi benih sintetik nenas pada berbagai konsentrasi natrium alginat, media, dan periode penyimpanan (*Generation ability of synthetic seeds of pineapple on several sodium alginate concentrations, conservation media, and periods*)

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Parameter (<i>Parameters</i>)				
	Hari pertama tumbuh (<i>First day growth</i>)	% daya regenerasi (<i>% regeneration</i>)	% kontaminasi (<i>% contamination</i>)	% <i>browning</i>	Warna tunas (<i>Shoot color</i>)
K1M1L1	10	100 c	0 a	0 a	Hijau
K1M1L2	10	100 c	0 a	0 a	Hijau
K1M1L3	*	*	*	*	*
K1M1L4	*	*	*	*	*
K1M2L1	10	100 c	0 a	25 b	Hijau
K1M2L2	Tt	0 a	0 a	50 c	Hijau gelap
K1M2L3	Tt	0 a	0 a	100 d	Hitam
K1M2L4	Tt	0 a	0 a	100 d	Hitam
K2M1L1	10	100 c	0 a	0 a	Hijau
K2M1L2	11	100 c	0 a	0 a	Hijau
K2M1L3	21	100 c	0 a	0 a	Hijau
K2M1L4	21	100 c	0 a	0 a	Hijau
K2M2L1	15	100 c	0 a	25 a	Hijau
K2M2L2	16	50 b	0 a	50 b	Hijau gelap
K2M2L3	Tt	0 a	0 a	100 d	Hitam
K2M2L4	Tt	0 a	0 a	100 d	Hitam

Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada taraf kepercayaan $p=0,05\%$ berdasarkan Uji DMRT, Tt: tidak tumbuh (*Numbers followed by the same letters are not significantly different from each other according to DMRT at $P=0.05\%$*)

*data pengamatan tidak diperoleh karena semua benih sintetik pada kombinasi perlakuan tersebut sudah tumbuh menjadi *plantlet* pada hari pengamatan ke-60 (*Date were not available since all synthetic seeds had already grown into plantlets on the both days of observation*)

adalah 0 dan 100%. Tunas pada benih sintetik dapat menembus matriks alginat mulai hari ke-10 setelah benih disubkultur pada media pertumbuhan. Namun demikian, penyimpanan selama 60 hari tidak cukup baik, pada pembuatan benih sintetik yang ditujukan untuk kegiatan konservasi *in vitro*. Dengan demikian, kegiatan dilanjutkan dengan meningkatkan konsentrasi natrium alginat untuk mendapatkan benih sintetik dengan daya regenerasi yang tinggi setelah periode penyimpanan yang lebih panjang.

Benih sintetik yang dibalut natrium alginat 4 % yang disimpan pada media akuades steril dapat bertahan hingga empat kali lipat lamanya (240 hari) daripada benih yang dibalut dengan natrium alginat 3%. Tunas pada benih sintetik tersebut memiliki persentase daya regenerasi hingga 100%.

Berbeda dengan penelitian enkapsulasi nenas, penggunaan natrium alginat lebih dari 3% pada tanaman *R. serpentina* akan menyebabkan benih sintetik memiliki bentuk yang tidak teratur, terlalu lunak untuk dibentuk sehingga kemampuan membalut tunas terlalu tebal sehingga tunas di dalam benih sulit bergerminasi (Gantait *et al.* 2017). Tertembusnya matriks natrium alginat 3% karena pertumbuhan tunas pada enkapsulasi benih sintetik nenas dapat disebabkan oleh daya regenerasi *in vitro* tanaman nenas yang cukup tinggi. Pada mikropropagasi nenas, satu buah eksplan nenas dapat menghasilkan hingga 47 tunas dalam waktu 4 minggu (Atawia *et al.* 2013) sehingga untuk memperlambat pertumbuhan tunas nenas diperlukan penggunaan natrium alginat yang lebih besar konsentrasinya.

Pada penelitian lain, penggunaan media $\frac{1}{2}$ MS pada matriks alginat dapat mempertahankan kesegaran tunas seperti yang juga diaplikasikan pada benih sintetik *Coffea arabica* L. (Nassar 2003). Lebih lanjut, penggunaan media MS tanpa zat pengatur tumbuh (ZPT) pada matriks alginat dapat membuat titik tumbuh nenas tetap hidup tanpa mengalami pertumbuhan. Aplikasi media MS0 pada kegiatan enkapsulasi dapat juga ditemukan pada *Vitis* sp. (Benelli 2016). Dengan demikian, penggunaan media MS dengan penambahan ZPT sebagai matriks pembalut benih sintetik nenas tidak diperlukan karena penggunaan ZPT justru akan memicu pertumbuhan tunas dalam benih sehingga benih sintetik tidak dapat disimpan dalam waktu yang panjang. Demikian halnya dengan zat retardan, seperti paklobutrazol dan manitol yang digunakan oleh Roostika *et al.* (2012) tidak diperlukan karena tanpa penggunaan zat tersebut, tunas nenas pada penelitian kali ini dapat bertahan lebih lama dari penelitian sebelumnya.

Lebih lanjut berdasarkan Tabel 1 juga dapat diketahui bahwa penyimpanan benih sintetik nenas yang dibalut dengan natrium alginat dalam botol tanpa media hanya dapat mempertahankan viabilitas tunas nenas hingga 30 hari dengan persentase *browning* 25% dan daya regenerasi 100%. Pada benih sintetik yang mengalami *browning*, tunas di dalam benih berubah menjadi hijau gelap dan menghitam, sedangkan yang tidak mengalami *browning*, tunas dalam benih sintetik tetap berwarna hijau segar. Pada periode penyimpanan yang lebih panjang dari 30 hari, benih sintetik dengan 3% natrium alginat terlihat berkerut. Hal tersebut dapat disebabkan karena menguapnya kandungan air dalam matriks pembalut sehingga tunas tidak lagi mendapat asupan nutrisi dari media sehingga akhirnya mati.

Pada benih sintetik dengan 4% natrium alginat yang disimpan dalam botol tanpa media, viabilitas benih dapat dipertahankan hingga 60 hari dengan persentase *browning* 50% dan daya regenerasi 50%. Hal tersebut mengimplikasikan bahwa penggunaan natrium alginat yang lebih besar konsentrasinya dapat mempertahankan viabilitas benih walaupun disimpan dalam botol tanpa media.

Pada penelitian enkapsulasi nenas yang telah dilakukan sebelumnya, benih sintetik disimpan dalam berbagai media MS dengan berbagai penambahan zat pengatur tumbuh sehingga benih mampu bertahan hingga 45 hari dalam penyimpanan (Soneji, Rao & Mhatre 2002). Pada penelitian ini, media akuades steril yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan tunas dalam benih sintetik. Dengan demikian, viabilitas tunas dalam benih sintetik dapat dipertahankan hingga 240 hari dan dapat beregenerasi dengan baik setelah disubkultur pada media pertumbuhan.

Pada parameter dan persentase kontaminasi semua perlakuan menunjukkan angka yang sama, yaitu 0%. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa teknik dan metode yang digunakan pada penelitian sudah cukup baik sehingga tidak ada data yang hilang karena kontaminasi.

Pengaruh Suhu dan Periode Penyimpanan Terhadap Daya Regenerasi Benih Sintetik Nenas

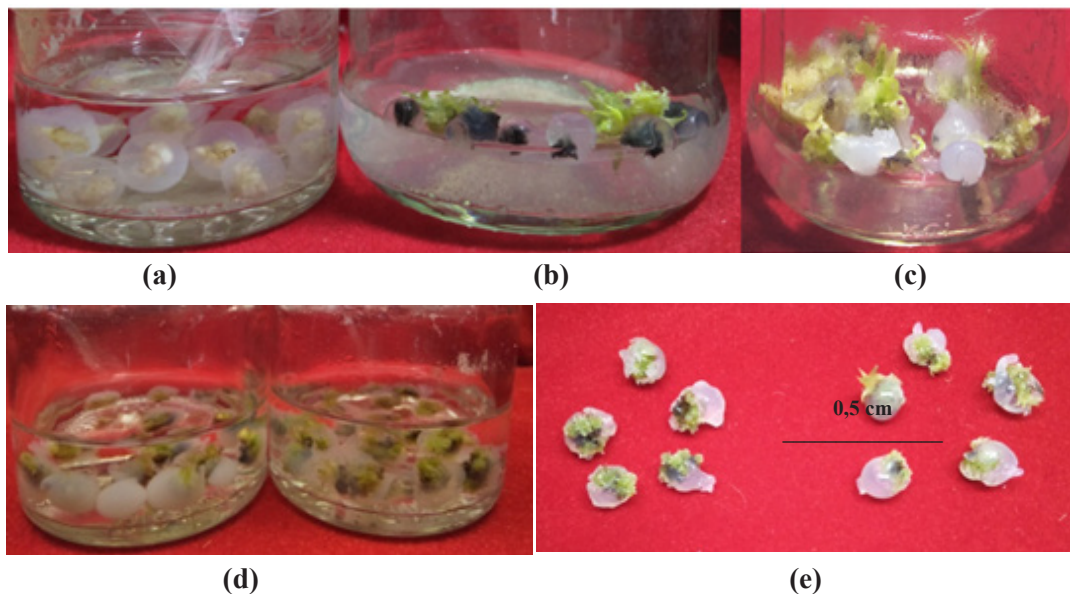
Penelitian enkapsulasi tanaman nenas dilanjutkan dengan menginvestigasi penggunaan suhu rendah (4°C) seperti yang telah dilakukan pada penelitian terdahulu (Soneji, Rao & Mhatre 2002), (da Silva *et al.* 2016). Data regenerasi benih sintetik yang diinkubasi pada suhu dan periode yang berbeda disajikan pada Tabel 2.

Pada suhu penyimpanan 25°C selama 30 hingga 240 hari, seluruh benih sintetik nenas menunjukkan daya regenerasi 100% (Gambar 2). Benih sintetik dapat menembus matriks alginat pada hari ke-10 hingga hari

Tabel 2. Daya regenerasi benih sintetik nenas pada beberapa perlakuan suhu dan waktu penyimpanan (Generation ability of synthetic seeds of pineapple on several conservation temperature and periodes)

Perlakuan (Treatments)	Parameter (Parameters)				
	Hari pertama tumbuh (First day growth)	% daya regenerasi (% regeneration)	% kontaminasi (% contamination)	% browning	Warna tunas (Shoot color)
S1L1	Tt	0 a	0 a	0 a	Hitam
S1L2	Tt	0 a	0 a	0 a	Hitam
S1L3	Tt	0 a	0 a	0 a	Hitam
S1L4	Tt	0 a	0 a	0 a	Hitam
S2L1	10	100 b	0 a	0 a	Hijau
S2L2	11	100 b	0 a	0 a	Hijau
S2L3	22	100 b	0 a	0 a	Hijau
S2L4	22	100 b	0 a	0 a	Hijau

Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata pada taraf kepercayaan $p=0,05\%$ berdasarkan Uji DMRT, Tt: tidak tumbuh (Numbers followed by the same letters are not significantly different from each other according to DMRT at $P=0.05\%$) Parameter hari pertama tumbuh tidak dianalisa karena setengah data Tt sehingga tidak dapat dikuantifikasikan (First day growth parameter was not statistically analyzed since half of the data were Tt, thus could not be quantified)



Gambar 1. Benih sintetik nenas: (a) langsung ditumbuhkan kembali pada media MS + 2 mg/L BAP, (b) 15 hari, (c) 45 hari setelah subkultur, (d) benih sintetik nenas yang disimpan pada suhu 25°C selama 240 hari dalam penyimpanan media akuades steril dan (e) benih sintetik yang mulai tumbuh setelah 10 hari setelah subkultur pada media MS + 2 mg/L BAP [Pineapple synthetic seeds: (a) were directly grew on MS + 2 mg/L BAP, (b) 15 days, (c) 45 days after subculture, (d) pineapple synthetic seed which were preserved on 25°C for 240 days on sterile aquadest media, and (e) synthetic seed which were started to grow 10 days after subculture on MS + 2 mg/L BAP]

ke-25 pada media pertumbuhan. Setelah disubkultur pada media pertumbuhan nenas (MS + 2 mg/l BAP), tunas nenas dapat menembus matriks alginat dan selanjutnya tumbuh membesar.

Tunas nenas di dalam kapsul benih sintetik yang disimpan pada suhu 25°C mengalami pelambatan pertumbuhan sehingga tunas masih terlihat segar berwarna hijau setelah disimpan hingga 240 hari. Pada kajian lain disebutkan bahwa untuk tanaman tropis, suhu penyimpanan yang dianjurkan adalah

15°C, di mana pada suhu tersebut materi konservasi masih memiliki daya regenerasi yang tinggi setelah penyimpanan hingga 180 hari (Cruz-Cruz, González-Arno & Engelmann 2013). Namun demikian, pada perlakuan suhu 25°C yang digunakan untuk penyimpanan benih sintetik nenas ternyata juga dapat memperlambat pertumbuhan tanpa mematikan tunas globular nenas, bahkan untuk periode yang lebih panjang, yaitu 240 hari. Plantlet yang tumbuh dari benih sintetik selanjutnya dapat digunakan kembali

sebagai sumber eksplan untuk perbanyakan *in vitro* (Reddy, Murthy & Pullaiah 2012).

Daya regenerasi beberapa varietas nenas yang merupakan plasma nutfah Indonesia setelah dikonservasi selama 240 hari merupakan hal yang menjanjikan bagi perkembangan kegiatan plasma nutfah tanaman buah tropika. Keberhasilan konservasi *in vitro* tanaman jangka menengah dengan cara enkapsulasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain sifat alami tanaman, matriks pembalut yang digunakan, suhu, dan fotoperiodisitas selama penyimpanan.

Selain untuk kepentingan konservasi, metode pembalutan tunas dengan matriks alginat sehingga membentuk benih sintetik dapat pula diaplikasikan dalam proses pemindahan dan pertukaran materi genetik tanaman nenas (Rai *et al.* 2009).

KESIMPULAN DAN SARAN

Pembalutan tunas globular oleh matriks alginat 4%, penyimpanan dalam akuades steril dan suhu 25°C dapat diaplikasikan untuk konservasi *in vitro* tanaman nenas. Teknik enkapsulasi tersebut dapat mempertahankan daya regenerasi benih sintetik nenas hingga 240 hari dengan daya regenerasi 100%.

Penyimpanan benih sintetik nenas pada suhu 4°C tidak disarankan karena suhu yang terlalu rendah dapat mematikan tunas *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alatar, AA, Ahmad, N, Javed, SB, Abdel-Salam, EM, Basahi, R & Faisal, M 2017, 'Two-way germination system of encapsulated clonal propagules of *Vitex trifolia* L.: an important medicinal plant', *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, vol. 92, no. 2, pp. 175–182.
2. Atawia, AR, Abd El-Latif, FM, El-Gioushy, SF, Sherif, SS & Kotb, OM 2013, 'Studies on micropropagation of pineapple', *Middle East Journal of Agriculture Research*, vol. 1, pp. 224–232.
3. Bartholomew, DP, Matos, AP de, Junghans, DT, Carvalho, ACPP de, Reinhardt, DHRC, Souza, FVD & Pádua, TRP de 2018, 'Advances in pineapple plant propagation', *Revista Brasileira de Fruticultura*, vol. 40, no. 6, pp. 1–22.
4. Benelli, C 2016, 'Encapsulation of shoot tips and nodal segments for *in vitro* storage of "Kober 5BB" Grapevine Rootstock', *Horticultural*, vol. 2, no. 10, pp. 1–8.
5. Benelli, C, Carlo, A De & Engelmann, F 2013, 'Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of Actinidia, Diospyros, Malus, Olea, Prunus, Pyrus and Vitis', *Biotechnology Advances*, vol. 31, no. 2, pp. 175–185.
6. Bhattacharyya, P, Kumar, V & Van Staden, J 2018, 'In vitro encapsulation based short term storage and assessment of genetic homogeneity in regenerated *Ansellia africana* (Leopard orchid) using gene targeted molecular markers', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 133, no. 2, pp. 299–310.
7. Cruz-Cruz, C, González-Arno, M & Engelmann, F 2013, 'Biotechnology and Conservation of plant biodiversity', *Resources*, vol. 2, no. 2, pp. 73–95.
8. Gámez-Pastrana, R, Martínez-Ocampo, Y, Beristain, CI & González-Arno, MT 2004, 'An improved cryopreservation protocol for pineapple apices using encapsulation-vitrification', *Cryo-Letters*, vol. 25, no. 6, pp. 405–414.
9. Gangopadhyay, G, Bandyopadhyay, T, Poddar, R, Gangopadhyay, SB & Mukherjee, KK 2005, 'Encapsulation of pineapple micro shoots in alginate beads for temporary storage', *Current Science*, vol. 88, no. 6, pp. 972–977.
10. Gantait, S, Kundu, S, Yeasmin, L & Ali, MN 2017, 'Impact of differential levels of sodium alginate, calcium chloride and basal media on germination frequency of genetically true artificial seeds of *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz.', *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, vol. 4, pp. 75–81.
11. Halim, NAA, Ramasamy, S, Tan, BC, Khalid, N & Yaacob, JS 2018, 'In vitro shoot regeneration and analysis of biochemical, antioxidant and anticancer properties of *Ananas comosus* var. MD2', *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, vol. 14, no. 2, pp. 263–268.
12. Haque, SM & Ghosh, B 2016, 'High-frequency somatic embryogenesis and artificial seeds for mass production of true-to-type plants in *Ledebouria revoluta*: an important cardioprotective plant', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 127, no. 1, pp. 71–83.
13. Indrayanti, R, Putri, RE, Sedayu, A & Adisyahputra 2018, 'Effect of paclobutrazol for *in vitro* medium-term storage of banana variant cv. Kepok (*Musa acuminata* x *balbisiana* Colla)', *AIP Conference Proceedings*, vol. 2019, no. 1, pp. 1–9.
14. Kishore, K, Singh, HS & Kurian, RM 2015, 'Paclobutrazol use in perennial fruit crops and its residual effects: A review', *Indian Journal of Agricultural Sciences*, vol. 85, no. 7, pp. 863–872.
15. Nassar, A 2003, 'Slow growth storage of encapsulated gerplasm of *Coffea arabica* L.', *International Journal of Agriculture and Biology*, vol. 5, no. 4, pp. 517–520.
16. Parveen, S, Mir, H, Ranjan, T, Pal, AK & Kundu, M 2019, 'Effect of surface sterilants on *in vitro* establishment of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill.) cv. Kew', *Current Journal of Applied Science and Technology*, vol. 33, no. 2, pp. 1–6.
17. Priyadarshani, SVGN, Hu, B, Li, W, Ali, H, Jia, H, Zhao, L, Ojolo, SP, Azam, SM, Xiong, J, Yan, M, ur Rahman, Z, Wu, Q & Qin, Y 2018, 'Simple protoplast isolation system for gene expression and protein interaction studies in pineapple (*Ananas comosus* L.)', *Plant Methods*, vol. 14, no. 1, pp. 1–12.
18. Rai, MK, Asthana, P, Kant, S, Jaiswal, VS & Jaiswal, U 2009, 'The encapsulation technology in fruit plants — A review', *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 6, pp. 671–679.
19. Rathore, MS & Kheni, J 2017, 'Alginate Encapsulation and *in vitro* plantlet regeneration in critically endangered medicinal plant, *withania coagulans* (Stocks) Dunal', *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, vol. 87, no. 1, pp. 129–134.

20. Reddy, MC, Murthy, KSR & Pullaiah, T 2012, 'Synthetic seeds : A review in agriculture and forestry', vol. 11, no. 78, pp. 14254–14275.
21. Roostika, I, Purnamaningsih, R, Supriati, Y, Khumaida, N, Wattimena, G 2012, 'Pembentukan benih sintetik tanaman nenas', *J. Hort.*, vol. 22, no. 4, pp. 316–326.
22. Roostika, I 2017, 'Perkembangan aplikasi teknik kriopreservasi untuk konservasi dan mendukung program pemuliaan tanaman', *Jurnal AgroBiogen*, vol. 9, no. 1, p. 39.
23. Siddique, I & Bukhari, NAW 2018, 'Synthetic seed production by encapsulating nodal segment of *Capparis decidua* (Forsk.), in vitro regrowth of plantlets and their physio biochemical studies', *Agroforestry Systems*, vol. 92, no. 6, pp. 1711–1719.
24. da Silva, RL, Ferreira, CF, da Silva Ledo, CA, de Souza, EH, da Silva, PH, de Carvalho Costa, MAP & Souza, FVD 2016, 'Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation', *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 127, no. 1, pp. 123–133.
25. Singh, B, Sharma, AES, Zaidi, GSVÆAA & Nagpal, ÆA 2007, 'In vitro response of encapsulated and non-encapsulated somatic embryos of Kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour · *C. deliciosa Tenora*)', , pp. 101–107.
26. Soneji, JR, Rao, PS & Mhatre, M 2002, 'Germination of synthetic seeds of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.)', *Plant Cell Reports*, vol. 20, no. 10, pp. 891–894.
27. Subdirektorat Statistik Hortikultura 2016, *Statistik tanaman buah-buahan dan sayuran tanaman Indonesia*, Badan Pusat Statistik, Jakarta, 99p.
28. Standardi, A & Micheli, M 2012, *Encapsulation of In Vitro-Derived Explants : An Innovative Tool for Nurseries*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 994, no. 1, pp. 397-418.
29. Yong, K & Mooney, DJ 2012, 'Progress in Polymer Science Alginate : Properties and biomedical applications', *Progress in Polymer Science*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126.
30. Zeynali, M, Maleki, B, Saba, J, Niazkhani, M & Ghaderian, M 2013, 'In vitro plant regeneration from alginate-encapsulated somatic embryos of rapeseed (*Brassica napus* cv . Tallayeh)', *International Journal of Traditional and Herbal Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 13–18.