

Pemuliharaan in vitro: Kaedah alternatif menghadapi perubahan iklim

(In vitro conservation: An alternative method in the face of climate change)

Suryanti Bustam, Rosliza Jajuli, Izlamira Roslan dan Abdul Muhamimin Abdul Kadir

Pengenalan

Purata suhu atmosfera didapati semakin meningkat sejak dua abad yang lalu. Bagi setiap tiga dekad yang terakhir ini, suhu atmosfera menjadi lebih panas secara berterusan berbanding dengan dekad lain sejak tempoh pra-industri. Purata suhu global dilaporkan telah meningkat sebanyak 0.85°C sejak tahun 1880. Perubahan iklim untuk abad ke-21 diunjurkan akan menjadi ketara dan cepat. Oleh yang demikian, jangkaan purata peningkatan bagi purata suhu permukaan ialah 4°C menjelang tahun 2100. Para pakar mendakwa bahawa perubahan iklim tidak dapat dihentikan dalam beberapa tahun yang akan datang. Ia dianggap sebagai salah satu punca masalah yang akan memberi kesan yang buruk terhadap sistem ekologi dan biodiversiti dunia. Ia juga mempengaruhi keselamatan pengeluaran makanan disebabkan oleh faktor ketidaktentuan cuaca yang amat ketara.

Dalam menghadapi peningkatan kemerosotan sumber semula jadi, pemuliharaan sumber genetik tumbuhan merupakan usaha yang sangat penting bagi memastikannya tersedia untuk digunakan bagi tujuan penambahaikan tanaman pada masa kini dan juga pada masa hadapan. Disebabkan oleh perubahan iklim, pemuliharaan in situ dilihat tidak dapat menjamin kelangsungan hidup bagi spesies langka dan endemik. Perubahan iklim menyebabkan banyak spesies jenis ini terancam. Untuk mencapai matlamat pemuliharaan dengan lebih berkesan bagi menghadapi perubahan cuaca, pemuliharaan ex situ juga perlu dilaksanakan. Salah satu teknik pemuliharaan ex situ yang sesuai dan selamat digunakan adalah pemuliharaan secara in vitro.

Pemuliharaan in vitro

Pemuliharaan in vitro merujuk kepada pemuliharaan germplasma yang melibatkan penyimpanan bahagian tumbuhan hidup yang mengandungi sumber genetik di dalam botol atau tiub dengan dibekalkan nutrien tertentu dan disimpan dalam persekitaran yang terkawal (*Gambar 1* dan *Gambar 2*). Kebiasannya, bahan tanaman in vitro perlu kerap dipindahkan/subkultur ke dalam bekas serta medium baharu bagi memastikannya untuk terus hidup. Objektif asas bagi pemuliharaan in vitro perlulah mengurangkan kekerapan proses subkultur dan juga dapat mengekalkan karakter genetik tumbuhan sepanjang tempoh pemuliharaan. Berbeza dengan pembiakan secara in vitro, tempoh



Gambar 1. Anak pokok *in vitro* di dalam botol



Gambar 2. Koleksi germplasma *in vitro* dengan persekitaran yang terkawal dari segi sumber cahaya, suhu dan kelembapan relatif

subkultur untuk pemuliharaan *in vitro* bagi kebanyakan tanaman dipanjangkan 6 – 24 bbulan atau lebih disebabkan oleh pertumbuhan yang telah diperlakukan. Ini bertujuan untuk mengurangkan kekerapan proses subkultur jika disimpan lama seterusnya dapat mengurangkan kos penyelenggaraan. Terdapat dua jenis pemuliharaan *in vitro* yang utama iaitu pemuliharaan pertumbuhan perlahan *in vitro* (penyimpanan jangkamasa pendek / sederhana) dan kriowetan (penyimpanan jangkamasa panjang). Artikel ini akan memberikan fokus terhadap pemuliharaan pertumbuhan perlahan *in vitro*. Pemuliharaan pertumbuhan perlahan *in vitro* boleh dicapai melalui penyimpanan pada suhu rendah dan/ atau pengurangan bekalan cahaya, bekalan medium pertumbuhan minimum, bekalan perencat pertumbuhan (asid abscisic, asid maleic hydrazide, cycocel, n-dimethyl succinamic dan phosphon-D), bekalan pengawal atur osmotik (mannitol, sorbitol); ataupun pengurangan

bekalan oksigen. Terdapat beberapa kelebihan pemuliharaan tumbuhan secara *in vitro* yang hanya memerlukan ruang yang sedikit untuk pemuliharaan sejumlah besar bahan tanaman berbanding dengan bank gen ladang (*in situ*). Melalui kaedah ini juga sumber genetik tidak terdedah dengan risiko kehilangan akibat pembangunan, bencana alam, perubahan iklim dan serangan serangga serta perosak yang merupakan penyebab utama kehilangan di dalam bank gen ladang. Pertukaran germplasma di peringkat kebangsaan dan antarabangsa juga menjadi mudah sekiranya bahan tanaman adalah dalam bentuk *in vitro*.

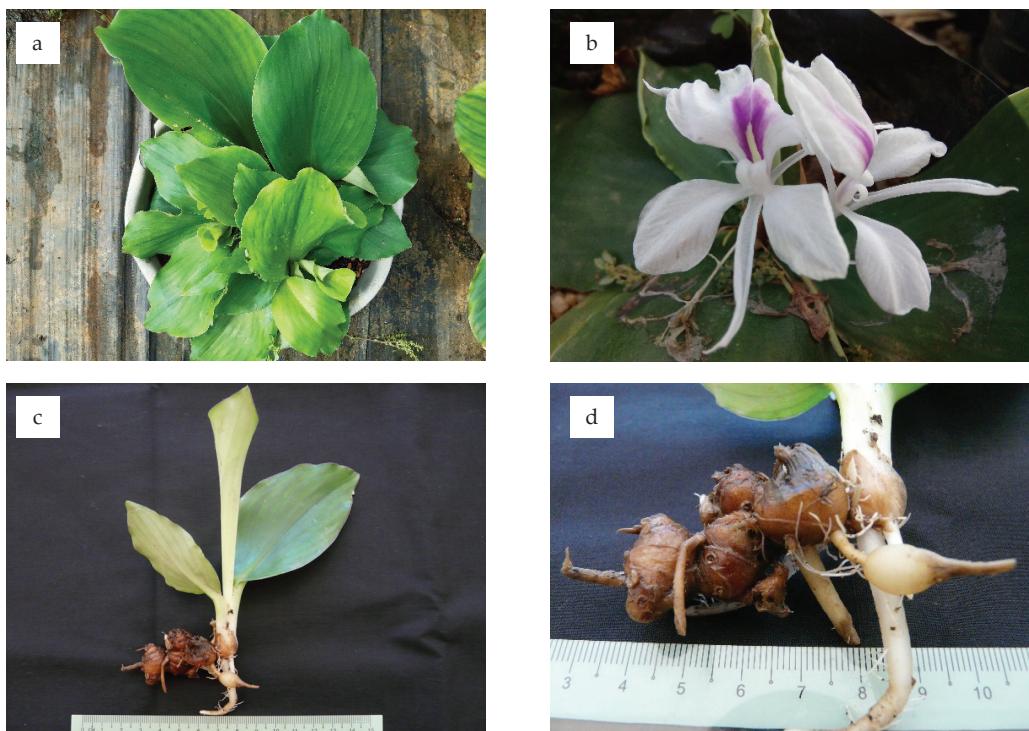
Jadual 1. Berikut adalah senarai bank gen in vitro penting di seluruh dunia serta maklumat pemuliharaannya

Bank gen	Aksesi	Tumbuhan
International Potato Center (CIP), Peru	13866*	Kentang, keledek, akar dan tuber 'Andea'
Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia	5714**	<i>Manihot</i>
Gatersleben Genebank, Germany	3122**	Kentang, <i>Allium</i> spp.
National Centre of Genetic Resource and Biotechnology (CENARGEN), Brazil	2221**	Ubi kayu, keledek, kentang, 'yam', asparagus, stevia, strawberry, pisang
International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Nigeria	1500**	<i>Dioscorea</i> spp.
National Bureau of Plant Genetic Resources (NBPGR), India	1327***	<i>Musa, Fragaria, Morus, Allium</i> spp., <i>Colocasia, Dioscorea, Ipomoea, Curcuma, Zingiber, Simmondsia</i> , tumbuhan ubatan dan beraroma
National Clonal Germplasm Repository (NCCG), USA	1301**	<i>Corylus, Fragaria, Humulus, Mentha, Pyrus, Ribes, Rubus, Vaccinium</i>
International Network for the Improvement of Banana and Plantain (INIBAP), Belgium	1051**	<i>Musa</i>
Institute of Plant Breeding, University of the Philippines Los Banos (IPB-UPLB)	866**	Kentang, pisang, Manila hemp, keledek, 'taro', 'yam', 'shallot', bawang putih, ubi kayu
Sweet Potato Repository, USA	800*	Keledek
Braunschweig Genetic Resources Centre (BGRC), Germany	778**	Kentang
Pacific Regional Agricultural Programme (PRAP), Fiji	390**	Keledek, 'taro', pisang, ubi kayu, 'yam', vanila
Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria (CORPOICA), Colombia	254**	<i>Solanum phureja, Ipomoea batatas, Musa</i> spp., <i>Allium</i> spp., <i>Canna edulis, Aracacia xanthorrhiza</i>
Caribbean Agricultural Research and Development Institute (CARDI), West Indies	153**	Keledek, ubi kayu, 'yam', nanas, <i>Anthurium</i>
Sugarcane Research Centre of Colombia (CENICANA), Colombia	100**	Tebu
Tissue Culture Laboratory, University of Ghana, Ghana	86**	'Yam' pisang dan 'plantain', ubi kayu, 'cocoyam'

Sumber: *Benson (1999), ** Engelmann (1999), ***NBPGR (2003)

Kaedah pemuliharaan *Kaempferia galanga* secara pertumbuhan perlahan in vitro

Kaempferia adalah genera dalam famili Zingiberaceae, merupakan tumbuhan herba renek yang menghasilkan rizom pendek dan akar membentuk tuber. Terdapat empat spesies *Kaempferia* yang boleh ditemui di Semenanjung Malaysia iaitu *K. galanga*, *K. rotunda*, *K. pulchra* dan *K. elegans*. *K. galanga* (Gambar 3) merupakan tumbuhan yang berasal dari India yang telah lama diperkenalkan untuk penanaman di Malaysia dan mudah didapati di seluruh negara. *K. galanga* biasanya dikenali sebagai 'lesser galangal' atau cekur/kencur oleh penduduk tempatan di Malaysia. Keseluruhan bahagian tumbuhan *K. galanga* mempunyai aroma dan bahagian yang boleh dimakan ialah daun dan rizom yang mana kedua-duanya digunakan dalam masakan. Selain digunakan dalam masakan, daun dan rizom banyak digunakan dalam perubatan tradisional. Ekstrak hasil rebusan rizom dan akar boleh digunakan sebagai tonik untuk ibu yang baru melahirkan. Daun hancur atau yang dilumatkan digunakan untuk merawat bengkak badan. Daun dan rizom dikurnyah bersama sedikit garam dapat melegakan tekak gatal. Selain itu, ia juga dipercayai boleh digunakan untuk menyembuhkan selesema, demam batuk, gastrik, ulcer, asma, masalah kulit, bronkitis, kegemukan, beguk, kegagalan jantung dan batuk kering.



Gambar 3. *Kaempferia galanga* (a) Pokok yang ditanam di dalam pasu, (b) bunga, (c) pokok bersama bahagian rizom dan (d) bahagian rizom

Menurut kajian terdahulu, *K. galanga* tergolong sebagai spesies terancam disebabkan oleh penuaan yang berleluasa dan tidak lestari bagi yang tumbuh meliar. Dengan melihat kepada kepentingan perubatannya, usaha untuk memulihara sumber genetik spesies ini adalah perlu. Pemuliharaan sumber genetik tumbuhan berfungsi untuk memastikan tanaman dan juga sumber genetik tanaman sentiasa tersedia secara berterusan untuk tujuan penambahbaikan tanaman melalui proses pembiakbakaan. Spesies ini biasanya dibiakkan secara vegetatif menggunakan potongan rizom. Kaedah pemuliharaan ex situ tanaman jenis ini dapat dilakukan dengan menyimpan koleksi tumbuhan hidup di bank gen ladang ataupun koleksi kultur tisu tanaman in vitro. Penjagaan pokok di bank gen ladang memerlukan masa dan tenaga kerja yang banyak dan risiko kehilangannya juga tinggi. Teknik pertumbuhan perlahan in vitro merupakan kaedah yang sesuai digunakan untuk memulihara germplasma bagi spesies ini. Menurut kajian, tambahan 3% atau lebih sorbitol ke dalam medium dan disimpan pada suhu 20 °C dilaporkan dapat mengurangkan pertumbuhan anak pokok keledek in vitro. Sistem regenerasi secara in vitro bagi *K. galanga* telah lama wujud. Walau bagaimanapun, masih tiada lagi laporan berkenaan pemuliharaan in vitro spesies ini yang dilaporkan sehingga kini. Oleh yang demikian, artikel ini melaporkan kajian yang telah dilaksanakan untuk mengenal pasti kesan tambahan sorbitol pada kepekatan yang berbeza dalam medium pertumbuhan untuk melambatkan pertumbuhan *K. galanga* semasa pemuliharaan in vitro.

Sumber eksplan dan pensterilan

Eksplan diperoleh daripada anak pokok muda *K. galanga* yang sihat selepas dua bulan tumbuh daripada rizom [Gambar 4(a)]. Anak pokok dipotong kira-kira 3 cm panjang yang mengandungi meristem pucuk dan juga sedikit bahagian umbisi dan dijadikan sebagai eksplan [Gambar 4(b)]. Helaian daun luar dibuang hingga tinggal 5 – 6 helai sahaja. Eksplan dicuci menggunakan air paip yang mengalir selama 30 minit dan direndam ke dalam larutan campuran 7 g/L racun kulat (Daconil 2787) dan 3 g/L streptomycin sulfate (Sigma) selama 30 minit. Di dalam kabinet aliran udara laminar, eksplan dibilas dengan air suling steril dan direndam dengan larutan 70% etanol selama lima minit diikuti 1.8% sodium hipoklorit selama 30 minit. Eksplan dibilas dengan air suling steril dan kemudian lapisan luar eksplan dibuang dan dipotong menjadi 5 mm sampel yang terdiri daripada meristem dan 2 mm umbisi dengan 3 – 4 helaian daun. Akhir sekali, eksplan dibilas menggunakan air suling steril sebanyak tiga kali dan dikultur secara aseptik pada medium agar Murashige dan Skoog (medium MS) separa pejal untuk penggandaan anak pokok bagi menyediakan sampel yang mencukupi untuk kajian [Gambar 4(c)]. Kultur disimpan pada 18/6 jam tempoh cahaya, $60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ cahaya (lampu LED), 60% kelembapan dan suhu 25 ± 2 °C.

Subkultur dilaksanakan setiap bulan sehingga bilangan sampel mencukupi untuk kesemua kajian diperoleh [Gambar 4(d)].

Rawatan pertumbuhan perlahan untuk pemuliharaan in vitro menggunakan sorbitol

Pucuk mengandungi meristem (5 mm) dipotong daripada anak pokok in vitro selepas proses penggandaan dan digunakan sebagai sampel untuk kajian pertumbuhan perlahan in vitro menggunakan sorbitol. Sampel dimasukkan ke dalam medium agar MS separa pejal yang ditambah dengan sorbitol pada kepekatan yang berbeza iaitu 0, 1, 2, 4 dan 6%. Kultur disimpan dalam keadaan serupa dengan proses multiplikasi. Secara keseluruhan, penggunaan sorbitol telah mempengaruhi pertumbuhan anak pokok in vitro *K. galanga*. Pengurangan bilangan dan panjang anak pokok dapat diperhatikan selepas 30 hari kultur dengan peningkatan kepekatan sorbitol. Walau bagaimanapun, perbezaan keputusan antara rawatan tidak berbeza secara ketara (*Jadual 2*). Respons yang sama juga telah diperhatikan pada Yacon selepas diberikan rawatan sorbitol. Bagi pemuliharaan selama 60 hari, bilangan anak pokok yang terhasil pada medium yang mengandungi sorbitol $\geq 2\%$ jauh lebih rendah (2.2 – 2.5 cm) berbanding dengan $\leq 1\%$ (3.5). Keputusan yang serupa dilihat pada panjang anak pokok di



Gambar 4. Proses penghasilan anak pokok *K. galanga* in vitro (a) anak pokok muda *K. galanga* berusia dua bulan, (b) 3 cm eksplan yang telah dipotong (c) 5 mm eksplan/sampel (d) penggandaan anak pokok yang terhasil daripada 1 eksplan/sampel

Jadual 2. Kesan kepekatan sorbitol yang berbeza dalam medium MS terhadap purata bilangan dan panjang anak pokok *K. galanga* setelah 30 dan 60 hari pemuliharaan pertumbuhan perlahan invitro

Kepekatan sorbitol (%)	Pemuliharaan 30 hari		Pemuliharaan 60 hari	
	Bilangan anak pokok in vitro	Panjang anak pokok (cm)	Bilangan anak pokok in vitro	Panjang anak pokok (cm)
0	2.6a	2.59a	3.5a	4.77a
1	2.4ab	2.48ab	3.5a	4.17b
2	1.9bc	2.06ab	2.5b	2.98c
4	1.3dc	1.98b	2.4b	3.33c
6	1.07d	1.21c	2.2b	2.25d

Nota: Min dengan abjad yang berlainan dalam kolumn yang sama adalah berbeza secara signifikan pada $p \leq 0.05$

mana medium yang mengandungi sorbitol $\geq 2\%$ menghasilkan anak pokok yang lebih rendah (2.25 – 3.3 cm) berbeza secara ketara dengan kepekatan $\leq 1\%$ (4.17 – 4.77 cm). Sepanjang pemuliharaan sehingga 90 hari, tiada perubahan morfologi yang tidak normal dapat diperhatikan pada anak pokok bagi semua rawatan (Gambar 5). Keputusan yang serupa juga diperoleh bagi Yacon di mana rawatan pertumbuhan perlahan in vitro untuk pemuliharaan tidak menyebabkan berlakunya perubahan fenotip bagi anak pokok. Sorbitol dengan kepekatan tinggi sehingga 6% didapati tidak berbahaya kepada anak pokok *K. galanga* kerana kesemua anak pokok mampu untuk terus hidup selepas disimpan selama enam bulan.



Gambar 5. Perbezaan pertumbuhan anak pokok in vitro selepas 90 hari apabila dibekalkan pengawal atur osmotik pada kepekatan berbeza (sorbitol dari kiri 0, 1, 2, 4, 6%)

Kesimpulan

Medium MS yang ditambah agen osmotik sorbitol pada kepekatan 2 – 6% boleh digunakan untuk tujuan pemuliharaan pertumbuhan perlahan in vitro bagi *K. galanga*. Ia mengekalkan kadar kebolehan untuk terus hidup yang tinggi, tidak menghasilkan anak pokok yang banyak dan melambatkan pemanjangan anak pokok sehingga 90 hari.

Penghargaan

Kajian ini dapat dilaksanakan dengan sumbangan dan sokongan kewangan dari Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia (MARDI) bawah Projek Rancangan Malaysia Ke-10 (RMKe 10-147). Penghargaan ditujukan kepada ketua projek iaitu Dr. Mohd Shukri Mat Ali @ Ibrahim kerana melibatkan kajian ini dalam projek yang diketuainya.

Bibliografi

- Benson, E.E. (1999). *Plant conservation Biology*. Taylor and Francis, London, UK
- Engelmann, F. (1999). Management of field and in vitro germplasm collections. Proceeding of a consultation meeting, 15-20 January 1996, CIAT, Cali Colombia. IPGRI, Rome, Italy
- Engelmann, F. (1991). In vitro conservation of tropical plant germplasm - A review. *Euphytica* 57: 227 – 243
- NBPG newsletter (2003). Newsletter (April-June). National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi, India
- Holtum, R.E. (1950). The *Zingiberaceae of the Malay Peninsula*. Gardens Bulletin Singapore 13: 1 – 249
- Dickinson, M., Prentice, I.C. dan Mace, G.M. (2015). Climate Change and Challenges for conservation. Imperial College London, Grantham Institute Briefing paper No. 13
- Larsen, K., Ibrahim, H.S., Khaw, H. dan Saw, L.G. (1999). *Gingers of Peninsular Malaysia and Singapore*. First Edition. Natural History Publication (Borneo) Sdn. Bhd., Kota Kinabalu, Malaysia
- Siti Fauziah, Y. (2013). *Ensiklopedia Tumbuhan Ubatan Malaysia*. First edition. Ar-Risalah Product Sdn. Bhd. Selangor, Malaysia. Hlm. 463
- Reed, D.H. (2012). Impact of climate change on biodiversity. Dalam: Handbook of Climate Change Mitigation, Chen, W.Y., Seiner, J., Suzuki, T. dan Lackner, M. eds. (Switzerland: Springer International Publishing m.s. 506 – 530
- Rukayah, A. (2000). *Ulam dan Sayuran Tempatan Semenanjung Malaysia*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Selangor, Malaysia. m.s. 21.
- Normah, M.N. (2008). *Rahsia dan Misteri Biji Benih Tropika Spesies Rekalsitran*. Penerbit Universiti Kebangsaan Malaysia, Bangi, Malaysia. m.s. 10 – 51
- Preetha, T.S., HemanthaKumar, A.S. dan Krishnan, P.N. (2013). Shoot Tip Cryopreservation in *Kaempferia galanga* L. an Endangered, Overexploited Medicinal Plant. *Tropical Asia. J. Phar. Bio. Sci.* 8(3): 19 – 23
- Shirin, F., Kumar, S. dan Mishra, Y. (2000). *In vitro* plantlet production system for *Kaempferia galanga*, a rare Indian medicinal herb. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 63: 193 – 197
- Rahman, M.M., Amin, M.N., Ahamed, T. dan Ahmad, S. (2005). *In vitro* rapid propagation of Black Thorn (*Kaempferia galanga* L.): A rare medicinal and aromatic plant of Bangladesh. *Journal of Biological Sciences* 5(3): 3,000 – 3,004
- Swapna, T.S., Binitha, M. dan Manju, T.S. (2004). *In vitro* multiplication in *Kaempferia galanga* Linn. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118(1 – 3): m.s. 233 – 241
- Negash, A., Krens, F., Schaart, J. dan Visser, B. (2001). *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 66: 107 – 111
- Taylor, M., Pone, S. dan Palupe, A. (1996). Slow Growth Strategies. Dalam: Normah, M.N., Narimah, M.K. dan Clyde, M.M. (eds), *In vitro conservation of Genetic Resources*. Universiti Kebangsaan Malaysia, Selangor, Malaysia. m.s. 119 – 134
- Skalova, I., Viehmannova, I., Vitamvas, J. (2012). *In vitro* Conservation of *Smallanthus sonchifolius* under Slow-growth Conditions. *Agricultura Tropica Et Subtropica* 5/3. m.s. 147 – 15

Ringkasan

Kaempferia galanga merupakan tumbuhan saka perubatan herba beraroma yang tergolong dalam famili Zingiberaceae. Rizom *K. galanga* dipercayai berpotensi untuk menyembuhkan batuk, hidung tersumbat, jangkitan pektoral, asma, bronkitis, malaria, penyakit kulit, luka dan darah tinggi. Artikel ini melaporkan kajian berkenaan kaedah pemuliharaan in vitro *K. galanga* dengan memperlakukan pertumbuhan anak pokok menggunakan rawatan sorbitol. Sampel in vitro *K. galanga* telah dikultur pada medium pemuliharaan iaitu medium separa pejal MS yang ditambah dengan sorbitol pada kepekatan yang berbeza iaitu 0, 1, 2, 4 dan 6%. Selepas 30 dan 60 hari tempoh pemuliharaan, purata bilangan dan panjang anak pokok diperhatikan untuk semua rawatan. Kajian ini membuktikan bahawa setelah 60 hari pemuliharaan, terdapat pengurangan terhadap purata bilangan anak pokok yang terhasil (3.5, 3.5, 2.5, 2.4 dan 2.2) dan purata ketinggian anak pokok (4.77, 4.17, 2.98, 3.33 dan 2.25 cm) disebabkan oleh peningkatan kepekatan sorbitol (masing-masing 0, 1, 2, 4 dan 6%). Oleh itu, dapat dibuktikan dengan jelas bahawa sorbitol dapat memperlakukan pertumbuhan anak pokok secara efektif semasa pemuliharaan in vitro. Berdasarkan hasil kajian kami, disimpulkan bahawa pemuliharaan jangka pendek dan sederhana *K. galanga* dapat dilakukan dengan menggunakan medium MS ditambah dengan 2 – 6% sorbitol.

Summary

Kaempferia galanga is a medicinal aromatic perennial herb belongs to the zingiberaceae family. The rhizomes are believed to have the potential to cure cough, nasal block, pectoral infection, asthma, bronchitis, malaria, skin disease, wound and hypertension. In this current report, studies have been done on in vitro conservation of *K. galanga* under slow-growth conditions by the applications of growth retardation treatments using sorbitol. The in vitro shoot of *K. galanga* were cultured on the in vitro conservation medium prepared using MS medium supplemented with different concentrations of sorbitol namely 0, 1, 2, 4 and 6%. After 30 and 60 days of conservation, the number of regenerated plants from shoots and the average of plants height were measured for all treatments. This study revealed that after 60 days of conservation, there was decline in the number of regenerated plants (3.5, 3.5, 2.5, 2.4 and 2.2) and the average of plants height (4.77, 4.17, 2.98, 3.33 and 2.25 cm) along with the increase in the concentration of sorbitol (0, 1, 2, 4 and 6% respectively). Thus, it was clear that sorbitol can be effectively slowed down plant growth during in vitro conservation. Based on our results, it was concluded that the medium-term conservation of *K. galanga* can be done using MS medium supplemented with 2 – 6% of sorbitol.

Pengarang

Suryanti Bustam

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekutaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

E-mel: suryanti@mardi.gov.my

Rosliza Jajuli (Dr.)

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekutaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor

Izlamira Roslan dan Abdul Muhammin Abdul Kadir

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM

43400 Serdang, Selangor