

# JURNAL

## TEKNOLOGI DAN MANAJEMEN PENGELOLAAN LABORATORIUM



**Jurnal**  
**Teknologi Dan Manajemen Pengelolaan Laboratorium**  
**(Temapela)**

Purnama Okviandari, Bambang Sugiharto	Teknik Kriopreservasi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Di Laboratorium Terpadu Dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Jember	Penyimpanan Pada Biakan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Di Laboratorium Terpadu Dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Jember	Hal 97 - 101
---	---	---	-----------------

## TEKNIK PENYIMPANAN KRIOPRESERVASI PADA BIAKAN *Agrobacterium Tumefaciens* DI LABORATORIUM TERPADU DAN SENTRA INOVASI TEKNOLOGI UNIVERSITAS JEMBER

Purnama Okviandari<sup>1</sup>, Bambang Sugiharto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, Universitas jember

email : <sup>1</sup>purnama.arin@gmail.com

### Abstrak

Salah satu cara menjaga kualitas biakan yang akan digunakan dalam penelitian adalah teknik penyimpanan yang baik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji viabilitas bakteri *Agrobacterium tumefaciens* setelah enam bulan penyimpanan dengan teknik kriopreservasi. Teknik kriopreservasi yang digunakan disesuaikan dengan ketersediaan alat pendingin yang ada. Diharapkan dengan penggunaan tehnik kriopreservasi dapat meningkatkan efisiensi dan viabilitas sel dalam jangka waktu enam bulan penyimpanan. Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV yang sudah terinsersi gen SPS dalam plasmid pKYS (GVpKYS SPS). Bakteri ditumbuhkan pada media yeast, peptone NaCL dengan penambahan antibiotik 100 ppm rifampisin, 12,5 ppm gentamisin dan 50 ppm kanamisin. Dalam biakan bakteri ditambahkan 15% gliserol sebagai kreoprotektan, kemudian dilakukan pembekuan menggunakan nitrogen cair (-196 °C) dan disimpan selama 6 bulan pada suhu dingin. Analisa yang dilakukan adalah uji viabilitas bakteri dan stabilitas genetik diawal dan akhir masa simpan. Hasil dari penelitian ini adalah ada beberapa keuntungan yang diperoleh dengan penyimpanan suhu dingin dengan penambahan krioprotektan yaitu viabilitas masih terjaga dan koloni bakteri yang masih memiliki materi genetik meskipun ada penurunan. Kesimpulan yang diperoleh adalah dengan penggunaan tehnik penyimpanan kriopreservasi viabilitas bakteri masih terjaga dengan baik.

*Kata kunci: Kreopreservasi, krioprotektan, Agrobacterium tumefaciens, plasmid pKYS (GVpKYS SPS), penyimpanan dingin*

### Abstract

One way to maintain the quality of culture that will be used in research is good storage techniques. The purpose of this study was to examine the viability of *Agrobacterium tumefaciens* after six months of storage with cryopreservation techniques. The cryopreservation technique used is adjusted to the availability of existing refrigeration equipment. It is expected that the use of cryopreservation techniques can increase cell efficiency and viability within a period of six months of storage. The study was conducted in the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology using *Agrobacterium tumefaciens* strain GV that has been inserted with the SPS gene in the pKYS plasmid (GVpKYS SPS). Bacteria were grown on yeast media, peptone NaCL with the addition of antibiotics 100 ppm rifampicin, 12.5 ppm gentamicin and 50 ppm kanamycin. In bacterial culture 15% glycerol is added as cryoprotectant, then freezing using liquid nitrogen (-196 °C) and stored for 6 months at cold temperatures. The analysis carried out is a test of bacterial viability and genetic stability at the beginning and end of the shelf life. The results of this study are that there are some benefits obtained by cold storage with cryoprotectant additions, namely viability is maintained and bacterial colonies that still have genetic material despite a decrease. The conclusion obtained is that the use of cryopreservation storage techniques for viability of bacteria is still well maintained.

*Keywords: Kreopreservation, cryoprotectant, Agrobacterium tumefaciens, plasmid pKYS (GVpKYS SPS), cold storage*

## I. PENDAHULUAN

Penelitian adalah bagian dari kegiatan belajar mengajar di perguruan tinggi. Pelaksanaan penelitian di laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi, Universitas Jember sebagian besar menggunakan bakteri bahkan seringkali menggunakan bakteri rekombinan. Oleh karena itu penyimpanan mikroorganisme merupakan salah satu kunci penting untuk mendapatkan suatu

material biologi yang berkualitas dan stabil. Menurut Kusmiati (2003) stabilitas suatu galur mikroorganisme akan menghindari hilangnya viabilitas (kemampuan hidup) sel dan terjadinya perubahan genetik.

Ada beberapa cara penyimpanan dan pemeliharaan bakteri salah satunya adalah sub kultur yaitu memindahkan bakteri secara berkala pada media baru. Cara ini kurang efektif karena memerlukan biaya dan waktu yang lebih banyak. Teknik

kriopresevasi (penyimpanan beku) merupakan alternatif pilihan karena merupakan teknik penyimpanan pada suhu yang sangat rendah ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) tanpa mempengaruhi organel-organel didalam sel sehingga fungsi biologis, fisiologis dan morfologis tetap ada (Kostaman dkk, 2011). Pada penelitian teknik penyimpanan krioproservasi biakan *A. tumefaciens* diharapkan dapat meningkatkan efisiensi dan viabilitas sel dalam jangka waktu enam bulan penyimpanan sehingga mendukung kegiatan penelitian.

Keterbatasan alat penyimpanan  $-80^{\circ}\text{C}$  dan keterbatasan ketersediaan nitrogen cair menjadi kendala penggunaan teknik kriopreservasi secara sempurna, sehingga bagaimana menerapkan tehnik kriopreservasi dengan mengupayakan alat dan bahan yang ada dan menguji viabilitas bakteri *A. tumefaciens* selama enam bulan penyimpanan akan dilakukan pada penelitian ini.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji viabilitas bakteri *Agrobacterium tumefaciens* setelah enam bulan penyimpanan dengan teknik kriopreservasi

Keutamaan penelitian adalah untuk menyediakan biakan *Agrobacterium tumefaciens* yang berkualitas yang nantinya akan berpengaruh pada kualitas hasil penelitian dan pembelajaran. Disamping itu teknik yang diperoleh juga bisa digunakan dilaboratorium lain untuk menyimpan bakteri secara umum dengan tetap menjaga viabilitas sel selama enam bulan. Untuk kelanjutan penelitian dilakukan uji viabilitas pada masa simpan yang lebih lama.

## II. METODE PENELITIAN

### a. Pembuatan Starter *A. tumefaciens*

Pembuatan stok gliserol diawali dengan membuat starter dari koloni tunggal *A. tumefaciens* dalam media YEP 2 ml dengan penambahan antibiotik 100 ppm refampicin, 12,5 ppm gentamisin dan 50 ppm kanamisin diinkubasi lebih kurang 48 jam pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$ . Setelah tumbuh starter dipindahkan ke dalam medis YEP 50 ml dengan perbandingan 1 : 50 sampai  $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,6$ .

### b. Kriopreservasi Biakan *A. tumefaciens*

Kriopreservasi diawali dengan memasukkan biakan bakteri dalam tube 1,5 ml. Total volume biakan *A. tumefaciens* adalah satu ml dengan kandungan glerol 15%. Setelah tercampur rata, biakan disiram dengan nitrogen cair sampai membeku, kemudian disimpan dalam  $-20^{\circ}\text{C}$  dengan segera, jangan sampai biakan mulai mencair.

### c. Menghitung Viabilitas *A. tumefaciens* dan Stabilitas Gen Inseri

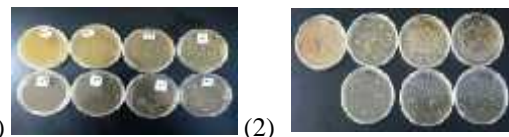
Pengukuran viabilitas sel dilakukan dengan cara pengenceran  $10^{-1}$  sampai  $10^{-5}$  kemudian ditumbuhkan dalam media YEP padat. Viabilitas dilakukan diawal dan di akhir penelitian yaitu setelah 6 bulan masa simpan.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian dilakukan pada biakan *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1 generasi kedua artinya bakteri sudah mengalami dua kali penyimpanan secara kriopreservasi pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bakteri *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1 meruapakan hasil transformasi genetik gen pKYS SoSPS pada *Agrobacterium* strain GV yang dilakukan pada tahun 2009. Analisis data awal dilakukan pada bakteri hasil peremajaan pertama yaitu dilakukan pengujian viabilitas dan materi genetik gen yang ada didalamnya. Analisa kedua dilakukan pada bakteri yang telah mengalami penyimpanan selama lebih kurang enam bulan (generasi ke dua) yaitu untuk mengetahui perubahan pada viabilitas dan materi genetik yang terkandung didalamnya.

### a. Uji Viabilitas Awal *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1

Uji viabilitas *A. tumefaciens* untuk mengetahui daya tumbuh bakteri sebelum dilakukan penyimpanan kriopresevasi



**Gambar (1).** Pertumbuhan koloni pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-9}$ , akan dipilih pengenceran terbaik, (2).Pengulangan dilakukan pada pengenceran  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  yang memiliki jumlah koloni 100-500.

Pengujian awal untuk menentukan viabilitas pada penyimpanan biakan *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1 generasi pertama mendapatkan data yang akan digunakan untuk menentukan faktor pengenceran yang tepat untuk menghitung jumlah bakteri dalam media cair. Dari Tabel 1 diketahui jumlah koloni yang bisa dihitung mulai pengenceran  $10^{-6}$ , sehingga digunakan sebagai acuan perhitungan viabilitas bakteri.



**Tabel 1.** Rata-rata jumlah koloni bakteri *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1 pada tingkat pengenceran  $10^{-1}$  sampai dengan  $10^{-9}$  (tiga kali pengulangan)

Jenis Bakteri	Jumlah Koloni pada Tingkat Pengenceran				
	$10^{-3/5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
<i>A. tumefaciens</i> GVpKYS SoSPS1		519	73	5	2

Penghitungan jumlah koloni dilakukan secara tidak langsung dengan metode pengenceran, dan jumlah koloni yang dipakai sebagai acuan jika tidak lebih dari 300 koloni. Menurut Pasta (2012) dan Lay (1994), jumlah koloni yang representatif untuk menggambarkan jumlah dan komposisi sel bakteri pada sampel cair adalah 30 sampai 300 koloni. Untuk *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1 dipilih dua tingkat pengenceran yaitu  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  yang mewakili.

**Tabel 2.** Rata-rata jumlah bakteri *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1 pada tingkatan pengenceran  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  (tiga kali pengulangan)

Uraian	Pengenceran $10^{-6}$	Pengenceran $10^{-7}$
Rata-rata Jumlah koloni	519 koloni	73 koloni
Rata-rata Jumlah bakteri/ml	$5.2 \cdot 10^8$ /ml	$7.3 \cdot 10^8$ /ml

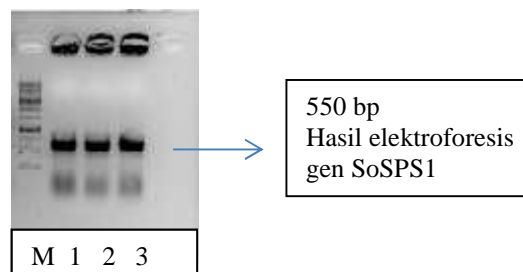
Dari hasil pengamatan diatas jumlah koloni bakteri yang mewakili adalah pada tingkat pengenceran  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$ , dengan jumlah bakteri pada setiap mili liternya berkisar  $5.2 \cdot 10^8$  /ml sampai  $7.3 \cdot 10^8$  /ml, jumlah koloni menjadi data awal dari penelitian yang dilakukan.

**b. Uji Materi Genetik *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1**

Uji materi genetik dilakukan untuk mengetahui keberadaan gen SoSPS1 yang terkandung dalam bakteri yang nantinya akan ditransformasi pada tanaman. Uji materi genetik dilakukan dengan analisa PCR (Polimerase Chain Reaction) menggunakan primer *Neomycin Phospotranferase* (*F NPTII* dan *R NPTII*). Bahan Primer untuk amplifikasi sebesar 550 bp merupakan gen penanda ketahanan plasmid pKYS pada antibiotik kanamisin.

Hasil PCR pada Gambar 3 menunjukkan terdapat pita DNA sebesar 550 bp sesuai dengan besarnya

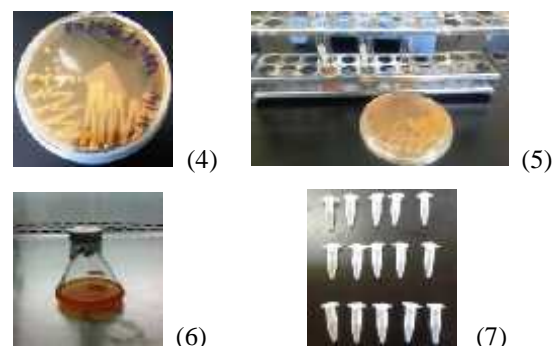
hasil amplifikasi yang digunakan, hal ini menggambarkan bahwa gen SoSPS1 sebagai materi genetik masih terdapat pada bakteri *A. tumefaciens*, sehingga dapat digunakan sebagai vektor transformasi pada tanaman.



**Gambar 3.** Hasil elektroforesis gen SPS menggunakan primer NPTII (550bp); M : marker 1 kb; No 1,2,3 : gen dari hasil isolasi Dna plasmid pKYSSoSPS1 menunjukkan adanya pita sebesar 550 bp.

**c. Kriopreservasi Biakan *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1**

Penyimpanan dengan kriopreservasi pada biakan *A. tumefaciens* bertujuan untuk tetap menjaga viabilitas dan keberadaan materi genetik didalam sel bakteri selama masa penyimpanan, kondisi diharapkan seperti pengujian awal. Tahapan penyimpnana kriopreservasi dimulai dari pembuatan koloni tunggal sampai penyimpanan.



**Gambar (4).** Koloni bakteri *A. tumefaciens* GVpKYSSoSPS1 siap untuk ditumbuhkan; (5) Koloni ditumbuhkan pada 2 ml YEP cair; (6) Biakan di media YEP cair 20 ml OD<sub>600</sub> 08 – 1; (7) Kriopreservasi siap disimpan di -20°C.

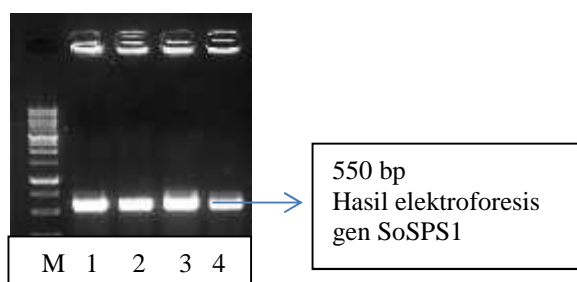
Setelah masa penyimpanan krioperservasi selama enam bulan akan dilakukan proses pengujian ulang pada viabilitas dan materi genetiknya. Penyimpanan kriopreservasi dilakukan beberapa perlakuan penyimpanan suhu dan perlakuan yang berbeda.

**Tabel 3.** Lama waktu inkubasi pertumbuhan bakteri untuk mencapai  $OD_{600} = 0,8$  dengan perlakuan ada penambahan nitrogen cair(+);tanpa penambahan nitrogen (-) cair dan suhu yang berbeda.

Uraian	Suhu Penyimpanan kriopreservasi dengan dan tanpa nitrogen cair				
	-80°C (+)	-80°C (-)	-20°C (+)	-20°C (-)	-4°C (-)
Waktu Inkubasi (jam)	16	24	24	28	28

Setelah masa simpan enam bulan menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  dengan penambahan nitrogen cair (+) memberikan waktu inkubasi untuk mencapai  $OD_{600} = 0,8$  selama 16 jam lebih cepat dibandingkan perlakuan lainnya (Tabel 3). Viabilitas masih terjaga pada suhu dingin dengan penambahan nitrogen cair dan penyimpanan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Menurut Kusmiyati (2003) dan Mahmud (2001) semakin rendah suhu penyimpanan semakin kecil peluang kehilangan viabilitas dan memelihara stabilitas genetik yang tinggi.

Hasil analisa materi genetik setelah masa simpan enam bulan menunjukkan adanya materi genetik yang sama dengan awal pengujian sebesar 550 bp hasil elektroforesis menggunakan primer NPTII (Gambar 4). Penyimpanan berulang tidak banyak mempengaruhi materi genetik jika dilakukan penyimpanan pada kondisi dingin karena akan menjaga materi genetiknya.



**Gambar 8.** Hasil elektroforesis gen SPS menggunakan primer NPTII (550 bp) pada masa setelah penyimpanan kriopreservasi  $-80^{\circ}\text{C}$  dengan penambahan nitrogen cair ; M : marker 1 kb; 1,2,3,4 : gen dari hasil isolasi Dna plasmid pKYSSoSPS1.

Dari hasil uji viabilitas dan uji materi genetik dapat diketahui bahwa terjadi perubahan pada viabilitas pertumbuhan koloni bakteri penyimpanan  $-80^{\circ}\text{C}$  dengan penambahan nitrogen. Terjadi penurunan jumlah koloni bakteri dalam setiap mililiternya menjadi 22-27 % dari jumlah koloni awal (Tabel 4).

**Tabel 4.** Rata-rata jumlah bakteri *A.tumefaciens* GVpKYS SoSPS1 pada tingkatan pengenceran  $10^{-6}$  dan  $10^{-7}$  (tiga kali pengulangan)

Uraian	Pengenceran $10^{-6}$	Pengenceran $10^{-7}$
Rata-rata Jumlah koloni	116 koloni	22 koloni
Rata-rata Jumlah bakteri/ml	$1.2 \cdot 10^8$ /ml	$2.2 \cdot 10^8$ /ml

## KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian tentang kriopreservasi biakan *A. tumefaciens* GVpKYS SoSPS1 dapat disimpulkan bahwa ada beberapa keuntungan yang diperoleh dengan penyimpanan suhu dingin dengan penambahan krioprotektan yaitu viabilitas masih terjaga dan koloni bakteri yang masih memiliki materi genetik meskipun ada penurunan. Penurunan terjadi dikarenakan bakteri sudah mengalami dua kali peremajaan (generasi kedua) sehingga disarankan peremajaan maksimal dilakukan sebanyak tiga kali dan setelahnya harus dilakukan transformasi genetik lagi dari gen pKYSSoSPS1 ke *Agrobacterium* yang baru.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amoah, B.K, H. Wu, C Spark and H.D. Jones (2001). Faktor Influencing *Agrobacterium* Mediated Transient Expression of *uidA* in Wheat Inflorescence Tissue. *Journal of Experimental Botany*. 52:1135-1142.
- Arencibia, A.D., Elva R. Carmona, Pillar Tellez, Ming-Tsair Chan, Su-May Yu, Luis E Trujillo And Pedro Oramas (1998). An Efficient Protocol for Sugarcane (*Saccharum spp.* L.) Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*. 7: 213-222.

Badjoeri M.(2010). Preservasi Mikroba untuk Pelestarian dan Stabilitas Plasma Nutfah. *Warta Limnologi Tahun XXIII No.45*: 1-9.

Jutono, Sudarsono S, Hartadi, Kabinun, Suhadi, Soesanto (1980), *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum*, Fakultas Pertanian, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta, 541 p.

Kusmiyati, Dedi Priadi (2003), Kriopreservasi Bakteri Silolitik *Bacillus pumilus* dengan krioprotektan berbeda, *Jurnal Biosmart*, vol 5 no.1 (21-24), April 2003.

Koestaman T, AR Setioko (2011), *Perkembangan Penelitian Teknik Kriopreservasi untuk penyimpanan Semen Unggas*, Balai Penelitian Ternak, Bogor 145-152.

Liu, G dan Ian,D.G. 2012. Highly Efficient sorghum transformation. *Plant Cell Rep.* 31:999-1007

Mahmud Muhammad (2005), *Teknik Penyimpanan dan Pemeliharaan Mikroba*, Buuletin Agrobio 4 (1), 24-52.

Gelvin., Galtier, N., Foyer, C.H., Huber, J. L. A., Voelker, T. A. and Huber, S. C (2003) effect of elevated Sucrose-phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. UC 82B). *Plant Physiol.* 101: 535-543.

Watson A.K, Kaspar H., Lategan M.J. and Gibson L (2008) Probiotics In Aquaculture The Need Principles and Mechanism of Action and Screening Processes, *Journal Aquaculture* 274: 1-4.

ISSN 2621-0878

