

Penyimpanan Tanaman Ubi-ubian dengan Metode Pertumbuhan Minimal dan Kriopreservasi

Novianti Sunarlim, M. Kosmiatin, I. Mariska, Hadiatmi, I.R. Tambunan, dan S. Rahayu

Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRAK

Penyimpanan ubi-ubian secara kultur *in vitro* di laboratorium mempunyai tujuan untuk memudahkan perawatan dan pengamatan selain memerlukan tempat yang tidak luas. Tanaman ubi jalar (*Ipomoea batatas*) dan ubi kayu (*Manihot utilisima*) selain disimpan dengan pertumbuhan minimal, juga dicoba untuk disimpan dengan kriopreservasi. Untuk pembekuan jaringan ubi jalar digunakan metode vitrifikasi. Krioprotektan yang dicoba ialah PVS1, PVS2, UBI, M (MS + sukrosa + manitol), dan V (VKM + sukrosa + manitol). Untuk optimasi ubi kayu digunakan media MS dan DKW dengan penambahan BA (0 dan 0,1 mg/l). Untuk mengurangi pelayuan pada ubi kayu dicoba dengan menambahkan AgNO₃, glutamin, dan arginin. Selain ubi jalar dan ubi kayu, ubi-ubian lainnya seperti yam (*Dioscorea alata*) juga dicoba untuk disimpan secara kultur *in vitro*. Perbanyakan tunas yam dicoba pada media MS + kinetin (0, 0,5, 1, 2, dan 4 mg/l) atau media MS dengan kombinasi kinetin (0, 1, dan 2 mg/l) dengan IAA (0; 0,5; dan 1 mg/l). Selain itu, dicoba juga pada media MS + BA (0; 0,5; 1, dan 2 mg/l). Media penyimpanan yang diteliti ialah paclobutrazol (0, 1, 3, dan 5 mg/l), ancymidol (0, 1, 2, dan 3 mg/l), dan manitol (0, 20, 40, 60, dan 80 g/l). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jaringan ubi jalar tetap berwarna hijau dan segar bila diberi perlakuan media pra perlakuan V yang direndam di dalam krioprotektan yang mengandung manitol dan sukrosa selama 16 jam, tetapi jaringan ini tidak dapat diregenerasikan setelah dibekukan. Untuk regenerasi ubi kayu dan mengurangi pelayuan secara umum media dasar DKW lebih baik daripada media dasar MS. Untuk perbanyakan tunas yam, konsentrasi kinetin dan BA terbaik berturut-turut ialah 2 dan 1 mg/l. Konsentrasi paclobutrazol dan ancymidol terbaik untuk media penyimpanan belum terlihat karena masa simpan baru berturut-turut 4,5 dan 4 bulan. Dengan bertambahnya zat penghambat pertumbuhan maka tinggi biakan berkurang, tetapi jumlah daun bertambah. Masih perlu pengamatan lebih lanjut setelah disimpan lebih dari satu tahun.

Kata kunci: *Ipomoea batatas*, *Manihot utilisima*, *Dioscorea alata*, kultur *in vitro*, pertumbuhan minimal, kriopreservasi

ABSTRACT

The purpose of the experiments were to conserve the tuber crops germplasm on *in vitro* culture in the laboratory in order to observe the plants easier and the space to store them is relatively smaller. Sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) and cassava (*Manihot utilisima*) were conserved with minimal growth and also with cryopreservation. The method for cryopreservation was vitrification with cryoprotectants of PVS1, PVS2, UBI, M (MS + sucrose + manitol), and V (VKM + sucrose + manitol). For cassava regeneration trials, BA, AgNO₃, and amino acids (glutamin and arginin) were applied to the base media of MS and DKW. Yam (*Dioscorea alata*) was tried to be conserved with minimal growth. Multiplication media tried was MS + kinetin (0, 0.5, 1, 2, and 4 mg/l) or MS with combination between kinetin (0, 1, and 2 mg/l) and IAA (0, 0.5, and 1 mg/l) or MS + BA (0, 0.5,

1, and 2 mg/l). For conservation media, growth retardant of paclobutrazol (0, 1, 3, and 5 mg/l), ancymidol (0, 1, 2, and 3 mg/l) and osmotic regulator of manitol (0, 20, 40, 60, and 80 g/l) were applied to the basic media of MS. Results of the experiments showed that the explants were still green at the pre culture media of V with the cryoprotectant of manitol and sucrose, but this explants can not be regenerated after they have been frozen. Basic medium of DKW was better than MS for regeneration of cassava. Media for multiplication of yam was MS + kinetin 2 mg/l or MS + BA 1 mg/l. They were needed to be stored over 1 year to found the best media for conservation. Increasing growth retardant decreased the plant height and leaf size, but increased the number of leaves.

Key words: *Ipomoea batatas*, *Manihot utilisima*, *Dioscorea alata*, *in vitro* culture, minimal growth, cryopreservation

PENDAHULUAN

Ubi-ubian umumnya disimpan dalam bentuk tanaman di kebun koleksi, namun dengan cara tersebut seringkali terjadi kehilangan genotipe tanaman karena gangguan hama penyakit dan cekaman lingkungan. Selain itu, diperlukan tempat yang luas, tenaga, dan biaya yang besar untuk mempertahankan tanaman di lapang. Untuk mengatasi masalah ini, ahli plasma nutfah mulai menyimpan tanaman secara kultur *in vitro*. Pada tahun 1980 *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR) menyarankan penyimpanan ubi jalar secara kultur *in vitro* (Love *et al.*, 1987). Kultur *in vitro* juga berguna untuk memperbanyak secara cepat dan dapat menghasilkan tanaman yang bebas penyakit sehingga sangat berguna bagi pemulia tanaman (Chee *et al.*, 1992). Menurut Kartha (1985), planlet ubi jalar dari jaringan meristem yang disimpan dengan medium Murashige dan Skoog (MS) dapat disimpan selama tiga bulan.

Cara penyimpanan kultur *in vitro* jaringan normal hanya dalam jangka pendek. Masalah yang dihadapi adalah subkultur atau pembaharuan media yang berulang-ulang sehingga meningkatkan kebutuhan tenaga kerja dan biaya, memberi peluang terjadinya kontaminasi, dan menurunkan integritas genetik biakan yang disimpan. Dalam kultur *in vitro* normal, tanaman kopi dapat disimpan selama beberapa bulan, dan dengan menumbuhkan planlet pada medium dengan konsentrasi nutrisi rendah dan kekurangan sukrosa, masa simpan dapat diperpanjang menjadi 2-2,5 tahun (Kantha, 1985). Penggunaan medium dengan konsentrasi nutrisi rendah pada kultur jaringan *Saccharum* spp. dapat memperpanjang daya simpan hingga 14 bulan tanpa pembaharuan (Taylor dan Dukie, 1993). Zat pengatur tumbuh paclobutrazol sering ditambahkan pada medium karena dapat memperpendek ruas batang serta memperpanjang masa dormansi sehingga akan meningkatkan daya konservasi (Wattimena *et al.*, 1992). Selain itu, zat yang berfungsi sebagai osmoregulator seperti D-manitol memang sudah sering digunakan untuk konservasi *in vitro* pada berbagai macam plasma nutfah (Withers dan Williams, 1985). Ubi kayu dan ubi jalar yang ditumbuhkan pada media dasar MS dan ditambahkan 30 μ M manitol menyebabkan pertumbuhan terhambat

(Unnikrishnan *et al.*, 1992). Di Filipina, penggunaan 2% manitol atau 1 mg/l ABA ubi kayu dapat disimpan tanpa kehilangan daya tumbuhnya setelah penyimpanan 6,5 bulan (Acedo, 1995). Di CIAT, penyimpanan ubi kayu dengan pertumbuhan minimal sudah dilakukan dan sekitar 5000 aksesori sudah disimpan secara mantap (Ashmore, 1997). Hasil penelitian di Balitbio yang dilakukan pada tahun 1998/99 menunjukkan bahwa konsentrasi manitol terbaik untuk penyimpanan ubi jalar adalah 4%. Tetapi tidak seluruh varietas dapat disimpan dengan media tersebut (Sunarlim *et al.*, 1999). Beberapa jenis talas juga telah berhasil dikonservasi menggunakan manitol (Bessembinder *et al.*, 1993).

Tanaman ubi-ubian lain seperti yam (*Dioscorea alata*) perlu dilestarikan juga. Pelestarian secara *in vitro* dengan pertumbuhan minimal merupakan salah satu alternatif dalam penyimpanan yam dan dapat mengurangi tenaga yang diperlukan pada penyimpanan di lapang. Menurut Mandal dan Chandel (1996) media MS dengan kinetin 2 atau 4 mg/l ditambah IAA 0,5 atau 1,0 mg/l dapat menghambat pertumbuhan dengan subkultur setiap 12 bulan.

Cara lain untuk menyimpan ubi jalar dan ubi kayu dalam kultur *in vitro* adalah dengan metode pembekuan (kriopreservasi). Penyimpanan dengan pembekuan merupakan metode yang potensial untuk penyimpanan jangka panjang plasma nutfah (Bajaj, 1979). Menurut Sakai (1993) penyimpanan dengan pembekuan sel dan meristem merupakan teknik penyimpanan untuk jangka waktu yang lama. Dalam teknik ini, sel dan meristem atau bagian lain dari tanaman dibekukan dan disimpan di bawah kondisi yang terkontrol dalam nitrogen cair pada suhu -196°C .

Teknik penyimpanan melalui pembekuan dapat dilakukan melalui beberapa metode antara lain pembekuan konvensional, pembekuan sederhana, dan vitrifikasi (pembekuan ultra cepat). Untuk metode vitrifikasi tidak diperlukan alat khusus untuk penurunan suhu secara bertahap. Towill dan Jarret (1992) telah mencoba metode vitrifikasi pada tanaman ubi menggunakan larutan vitrifikasi PVS2 (campuran gliserol, etilen glikol, dan DMSO). Setelah penyimpanan dalam nitrogen cair, tunas tetap mempunyai kemampuan untuk beregenerasi. Hasil penelitian Reinhoud *et al.* (1995) menunjukkan bahwa dengan metode vitrifikasi, periode pra kultur lebih cepat, keberhasilan lebih tinggi serta daya regenerasi lebih cepat dibandingkan dengan metode pembekuan lambat. Walaupun demikian, hasil penelitian Martin *et al.* (1993) menunjukkan bahwa perlakuan *thawing* (pelelehan) setelah penyimpanan berpengaruh pula terhadap keberhasilan kriopreservasi.

Tujuan penelitian adalah (1) mendapatkan metode pra kultur pada penyimpanan dengan pembekuan pada ubi jalar, serta formulasi media untuk regenerasi jaringan yang sudah dibekukan pada tanaman ubi jalar dan ubi kayu dan (2) mendapatkan metode multiplikasi tunas dan penyimpanan dengan pertumbuhan minimal pada yam.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di rumah kaca dan Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor.

Studi Penyimpanan Ubi Jalar dengan Kriopreservasi

Bahan tanaman yang digunakan untuk penelitian ini ialah jaringan apeks dan tunas satu buku yang telah steril. Metode pembekuan yang dicoba ialah meto-de vitrifikasi dari Sakai *et al.* (1990) dan Prasetyorini (1999). Jaringan yang akan di-bekukan dikulturkan pada media pra kultur dengan media dasar MS atau modifikasi media Kao dan Michayluk (VKM). Perlakuan yang dicoba adalah pemberian sukrosa (210 dan 240 mg/l) dan kombinasi manitol (31,8 g/l) dengan sukrosa (32,8 g/l) selama dua hari. Bahan tanaman disimpan berupa jaringan yang langsung dibekukan atau dienkapsulasi terlebih dahulu dengan Ca-alginat 1,5%. Untuk memadatkan kapsul digunakan CaCl_2 50 mM. Jaringan kemudian dimasukkan ke dalam kriovial yang berisi larutan krioprotektan PVS1, PVS2, UBI, M, dan V (Tabel 1). Sebelum dibekukan, jaringan diberi perlakuan penurunan suhu di lemari pendingin selama 16 jam. Pelelehan (*thawing*) dilakukan dengan metode Prasetyorini (1999). Jaringan yang hidup dikulturkan pada media pra perlakuan sebelum dibekukan selama 48 jam, kemudian diregenerasikan.

Studi Regenerasi Jaringan Ubi Jalar dan Ubi Kayu

Apeks ($\pm 0,5$ mm) dan/atau tunas ($\pm 0,5$ cm) digunakan dalam penelitian ini. Media yang dicoba untuk ubi jalar ialah MS0 + sukrosa 2 dan 3%, MS + sukrosa 2% + kinetin (0; 1,0; 1,5; dan 2,0 mg/l). Sedangkan untuk ubi kayu dicoba dua macam media dasar, yaitu MS dan DKW yang dikombinasikan dengan BA (0 dan 0,1 mg/l) AgNO_3 (0 dan 1 mg/l) dan asam amino (arginin dan glutamin). Pengamatan dilakukan untuk persentase jaringan yang hidup dan yang dapat diregenerasikan setelah penyimpanan dengan pembekuan, waktu pertunasan, jumlah tunas, dan persentase pembentukan kalus.

Penyimpanan Yam secara Kultur *In Vitro* dengan Pertumbuhan Minimal

Tanaman yam dari lapang ditanam di rumah kaca sebagai sumber eksplan untuk perbanyakan di laboratorium. Tunas disterilkan menggunakan

Tabel 1. Komposisi larutan krioprotektan

Bahan kimia	PVS1 (%)	PVS2 (%)	UBI (%)	M (%)	V (%)
Propilen glikol	13	-	-	-	-
Gliserol	22	30	20	-	-
Etilen glikol	13	13	10	-	-
DMSO	6	5	-	-	-
Sukrosa	3	3	3	3,28	3,28
Manitol	-	-	-	3,28	3,28

PVS1, PVS2, UBI, M = pada media dasar MS; V = pada media dasar VKM

alkohol 70%, clorox 30 dan 20% kemudian ditumbuhkan pada media MS. Perbanyak tunas dicoba pada media MS + BA dengan konsentrasi 0; 0,5; 1,0; dan 2,0 mg/l. Media MS + kinetin pada konsentrasi 0; 0,5; 1; 2; dan 4 mg/l dan kombinasi antara kinetin (0, 1, dan 2 mg/l) dengan IAA (0; 0,5; dan 1 mg/l) juga dicoba untuk perbanyak tunas yam. Pengamatan yang dilakukan ialah tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah cabang, dan perakaran.

Media penyimpanan yang diteliti ialah MS + zat penghambat pertumbuhan paclobutrazol (0, 1, 3, dan 5 mg/l) dan ancymidol (0, 1, 2, dan 4 mg/l) serta stabilisator osmotik manitol (0, 20, 40, 60, dan 80 mg/l). Makin lama tanaman dapat disimpan tanpa subkultur berulang kali dengan persentase tumbuh yang tinggi setelah penyimpanan, merupakan media terbaik untuk tanaman yam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi Penyimpanan Ubi Jalar dengan Kriopreservasi

Hasil penelitian awal menunjukkan bahwa jaringan yang dikulturkan pada media pra kultur dengan konsentrasi sukrosa sangat tinggi (210 dan 240 g/l), tidak dapat diregenerasikan. Jaringan yang dikulturkan pada media dengan kombinasi sukrosa dan manitol dapat diregenerasikan walaupun memerlukan waktu lama (Tabel 2). Penyimpanan dengan metode vitrifikasi merupakan pembekuan yang ultra cepat karena bahan tanaman langsung dibekukan. Untuk mengatasi masalah kerusakan fisik maupun kimia maka jaringan diperlakukan terlebih dahulu untuk mengeluarkan cairan dari sitoplasma (Sakai, 1993). Perlakuan sukrosa 210 dan 240 g/l tampaknya menyebabkan sel mengalami tingkat dehidrasi yang sangat tinggi, sehingga tidak mempunyai kemampuan untuk beregenerasi bahkan jaringan menunjukkan warna coklat.

Tunas satu buku memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan apeks. Pra kultur pada apeks yang ukurannya lebih kecil dari tunas satu buku menyebabkan tingkat dehidrasi yang tinggi, sedangkan tingkat dehidrasi pada tunas satu buku hanya terjadi pada sebagian sel dan jaringan penyusun organ tanaman. Dengan pemakaian stabilisator osmotik yang relatif lebih sederhana (kombinasi manitol dan sukrosa) kombinasi dengan media VKM yang kandungan ion dan senyawa organiknya lebih kompleks (untuk

Tabel 2. Persentase jaringan hidup ubi jalar setelah perlakuan dengan media pra kultur

Media pra kultur (2 hari)	Persentase jaringan hidup pada media pra kultur (%)	Persentase regenerasi pada media regenerasi (%)
MS + sukrosa 210 g/l	100	Mati-coklat
MS + sukrosa 240 g/l	100	Mati-coklat
MS + manitol 32,8 g/l + sukrosa 32,8 g/l	100	20
VKM + manitol 32,8 g/l + sukrosa 32,8 g/l	100	100

memelihara viabilitas sel) maka organ tunas satu buku dapat hidup semua pada media regenerasi.

Jaringan tanpa pra kultur dan dengan pra kultur direndam dalam larutan krioprotektan selama 16 jam, hasilnya menunjukkan bahwa semua jaringan tidak dapat bertahan hidup. Untuk menanggulangi kejadian tersebut, maka jaringan di-lindungi dengan enkapsulasi memakai Ca-alginat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa krioprotektan yang digunakan tidak dapat digunakan pada jaringan apeks, kecuali pada krioprotektan PVS1 150%. Pada tunas satu buku, setelah perendaman semua jaringan dapat bertahan hidup tetapi setelah diregenerasikan, biakan yang hidup hanya yang dikulturkan dalam media krioprotektan MS ditambah sukrosa 32,8 g/l dan manitol 32,8 g/l serta VKM ditambah sukrosa 32,8 g/l dan manitol 32,8 g/l yang berhasil beregenerasi (Tabel 3).

Jaringan yang berhasil dibekukan ketika *dithawing*, umumnya masih ber-warna hijau tetapi teksturnya agak lembek walaupun masih tetap terlindungi oleh kapsul alginat. Organ tanaman yang lembek menunjukkan adanya kerusakan pada saat pembekuan. Kemungkinan jaringan tanaman tidak dapat dibekukan secara cepat tetapi perlu beradaptasi pada temperatur yang rendah terlebih dahulu. Setelah disubkultur pada media regenerasi, jaringan yang berwarna hijau mulai memudar sampai akhirnya berwarna putih atau coklat. Jaringan ubi jalar yang sudah berwarna putih atau coklat tidak mampu beregenerasi.

Studi Regenerasi Jaringan Ubi Jalar dan Ubi Kayu

Hasil penelitian regenerasi tunas satu buku tanpa daun dan jaringan apeks ubi jalar menunjukkan bahwa penambahan kinetin dapat memacu pertumbuhan tunas. Penambahan kinetin terbaik untuk pertumbuhan tunas ialah 1 mg/l. Penambahan kinetin 2 mg/l menyebabkan pertumbuhan daun

Tabel 3. Persentase jaringan hidup ubi jalar yang dienkapsulasi setelah diperlakukan dengan krioprotektan selama 16 jam

Krioprotektan	Persentase jaringan hijau setelah direndam (%)		Persentase jaringan hidup pada media regenerasi (%)
	Apeks	Tunas 1 buku	Tunas 1 buku
PVS 1 50%	20	80	Mati-coklat
PVS 1 100%	0	80	Mati-coklat
PVS 1 150%	0	100	Mati-coklat
PVS 2 50%	0	80	Mati-coklat
PVS 2 100%	0	80	Mati-coklat
PVS 2 150%	0	80	Mati-coklat
UBI	-	40	Mati-coklat
MS + Man 32,8 g/l + Suk 32,8 g/l	-	100	20
VKM + Man 32,8 g/l + Suk 32,8 g/l	-	100	100

Suk = sukrosa, Man = manitol, PVS1 = propilene glikol 13% + gliserol 22% + etilen glikol 13% + DMSO 6% dalam MS dan sukrosa 3%, PVS2 = gliserol 30% + etilen glikol 15% + DMSO 5% dalam MS dan sukrosa 3%, UBI = gliserol 20% + etilen glikol 10% dalam MS dan sukrosa 3%

dan buku lebih baik serta memacu pertumbuhan kalus dengan visual kalus yang kompak (Tabel 4). Kinetin termasuk golongan sitokinin yang dapat memacu pembelahan sel dan meningkatkan aktivitas auksin endogen sehingga pada kinetin konsentrasi tinggi terbentuk kalus pada pangkal tunas.

Pengurangan sukrosa dari 3% menjadi 2% dalam media MS0 pada kultur meristem ternyata tidak menunjukkan hasil yang berbeda, kedua komposisi media tersebut tidak dapat menginduksi meristem untuk membentuk tunas (Tabel 4). Apeks merupakan organ yang sangat kecil sehingga diperlukan penambahan kinetin dalam media untuk membentuk tunas.

Pada kultur *in vitro* ubi kayu sering ditemui adanya pelayuan yang relatif cepat pada biakan, sehingga untuk mengatasinya ditambahkan komponen organik, yaitu asam amino (arginin dan glutamin) dan AgNO₃. Penambahan senyawa tersebut dapat menghambat aktivitas etilen (Purnamaningsih *et al.*, 1998). Etilen yang dilepaskan dapat menyebabkan gejala pelayuan yang terjadi secara dini pada berbagai tanaman tahunan berkayu. Di samping itu, glutamin dan arginin merupakan sumber N organik yang lebih mudah digunakan dari N anorganik. Dengan demikian, kedua asam amino ini dapat meningkatkan pertumbuhan biakan.

Pertumbuhan tunas satu buku ubi kayu pada media dasar DKW umumnya lebih baik daripada media dasar MS. Penggunaan media dasar DKW juga relatif mampu menekan pelayuan pada biakan. Pelayuan pada media DKW dengan penambahan glutamin 100 mg/l terjadi mulai minggu ke-6 lebih lambat satu minggu daripada media MS (Tabel 5). Media DKW tersusun dari garam anorganik yang lebih kaya dibandingkan dengan media MS terutama ion sulfat yang berperan dalam pembentukan asam amino yang mengandung sulfur, yaitu sistein dan metionin. Kedua asam amino tersebut berperan langsung dalam proses metabolisme pembentukan acetyl coenzim A (Marschner, 1986). Pelayuan ini dapat juga terjadi karena eksplan berasal dari biakan yang sudah lama dikulturkan. Penambahan BA 0,1 mg/l tidak memberikan hasil yang lebih baik pada semua parameter yang diamati. Untuk mengoptimalkan regenerasi ubi kayu mungkin perlu ditingkatkan konsentrasinya.

Penyimpanan Yam secara Kultur *In Vitro* dengan Pertumbuhan Minimal

Sterilisasi yam yang dilakukan di rumah kaca menggunakan alkohol 70% selama 7 menit, clorox 30% selama 5 menit, dan clorox 20% selama 5 menit. Tunas yang tumbuh kemudian ditumbuhkan pada media MS. Untuk

Tabel 4. Pertumbuhan tunas satu buku dan apeks ubi jalar pada umur 6 minggu dalam berbagai media dengan beberapa taraf konsentrasi sukrosa dan kinetin

Media	Waktu inisiasi (hari)		Jumlah tunas		Persentase pembentukan kalus (%)	
	1 buku	meristem	1 buku	meristem	1 buku	Meristem
S 3%	21,7	24,0	1,2	-	0	0
S 2%	14,7	24,0	1,5	-	0	0
S 2% + K 0,5 mg/l	10,0	18,1	1,8	1,0	100	100
S 2% + K 1,0 mg/l	10,0	11,0	2,5	1,1	100	100
S 2% + K 1,5 mg/l	12,3	18,3	2,0	0,8	67	100
S 2% + K 2,0 mg/l	10,9	18,4	2,3	0,9	100	100

S = sukrosa, K = kinetin

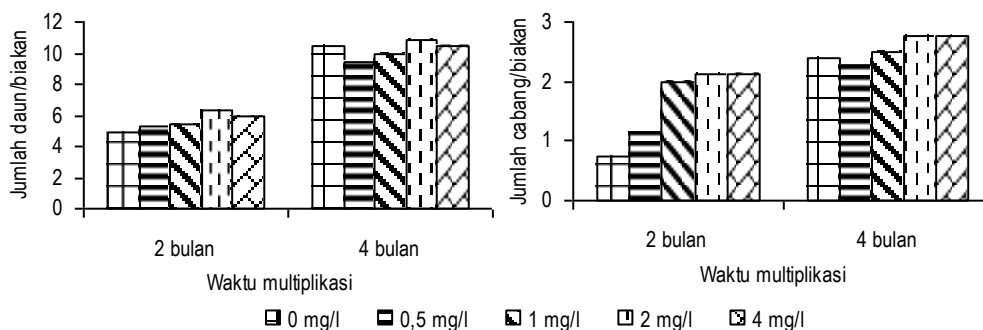
Tabel 5. Jumlah tunas, daun, dan daun layu tanaman ubi kayu pada umur 6 minggu dalam berbagai perlakuan media dasar dan sumber N

Media dasar (mg/l)	Jumlah tunas	Jumlah daun	Jumlah daun layu
MS + AgNO ₃ 1 + BA 0,1 + NAA 0,01	1,0	3,1	0,6
MS + AgNO ₃ 1 + NAA 0,01	1,0	6,0	1,4
MS + arginin 100 + BA 0,1 + NAA 0,01	1,0	3,0	0,8
MS + arginin 100 + NAA 0,01	1,0	4,5	0,7
MS + glutamin 100 + BA 0,1 + NAA 0,01	1,2	4,7	1,2
MS + glutamin 100 + NAA 0,01	1,0	3,5	1,0
DKW + AgNO ₃ 1 + BA 0,1 + NAA 0,01	1,4	2,4	0,8
DKW + AgNO ₃ 1 + NAA 0,01	1,2	4,8	0,7
DKW + arginin 100 + BA 0,1 + NAA 0,01	1,0	3,0	0,8
DKW + arginin 100 + NAA 0,01	1,0	5,5	1,2
DKW + glutamin 100 + BA 0,1 + NAA 0,01	2,0	3,5	0,7
DKW + glutamin 100 + NAA 0,01	1,2	5,7	0,5

mendapatkan multi-plikasi yang cepat maka zat pengatur tumbuh ditambahkan pada media multiplika-si. Percobaan dengan beberapa konsentrasi kinetin menunjukkan bahwa setelah empat bulan pertumbuhan, diperoleh jumlah daun dan cabang terbanyak dari kinetin 2 mg/l. Perbedaan antar perlakuan tidak terlalu nyata, tanpa perlakuan kinetin jumlah daun dan cabang cukup banyak bahkan lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan kinetin 0,5 mg/l (Gambar 1). Dengan kandungan sitokinin alami yang memadai tampaknya biakan mampu tumbuh membentuk tunas baru sama baiknya dengan yang diberi kinetin.

Pada multiplikasi yam menggunakan kinetin terlihat bahwa makin tinggi konsentrasi kinetin, makin kecil ukurannya. Tanpa kinetin ukuran daun besar, pada konsentrasi kinetin 1 mg/l sebagian daun berukuran sedang tetapi lebih banyak yang kecil, dan di atas 1 mg/l ukuran daun bertambah kecil. Dengan mengecilnya daun berarti pertumbuhannya mulai terhambat, maka kemungkinan waktu untuk subkultur dapat diperlambat. Menurut Mandal dan Chandel (1996), penambahan kinetin 2 dan 4 mg/l memperlambat pertumbuhan sehingga subkultur dapat dilakukan selang 6-8 bulan.

Percobaan lain menggunakan zat pengatur tumbuh BA memperlihatkan jumlah daun dan cabang tertinggi pada konsentrasi 1 mg/l (Gambar 2). Berbeda dengan pengaruh kinetin, maka penambahan BA tidak memperkecil ukuran daun. Walaupun sudah diberi BA 1 mg/l ukuran daun tetap besar. Jumlah daun dan cabang dengan perlakuan kinetin 2 mg/l dan BA 1 mg/l sama. Jumlah daun dan cabang pada perlakuan kinetin 2 mg/l adalah 10,9 dan 2,8, sedangkan perlakuan BA 1 mg/l adalah 10,4 dan 2,8. Zat pengatur tumbuh BA merupakan sitokinin yang mempunyai daya aktivitas lebih kuat dibandingkan dengan kinetin. Sitokinin dapat meningkatkan kandungan RNA, asam amino, dan klorofil yang dibutuhkan untuk pembentukan sel-sel baru. Dengan demikian, peningkatan konsentrasi BA akan meningkatkan pula ketiga komponen organik tersebut, sehingga dengan sendirinya tunas lebih banyak dan ukuran daun tetap besar. Bila tiap buku dengan satu daun disubkultur, daun yang kecil maupun besar dapat tumbuh kembali secara

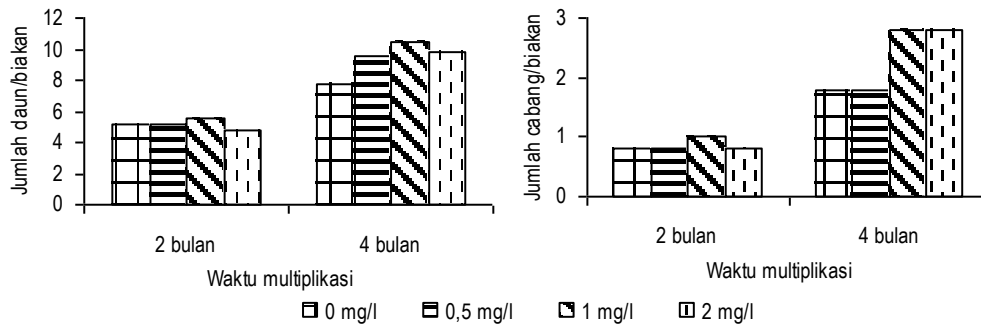


Gambar 1. Pengaruh konsentrasi kinetin terhadap pembentukan daun/biakan dan cabang/biakan yam pada umur 2 dan 4 bulan

normal tanpa ada perbedaan.

Multiplikasi yam menggunakan media dasar MS dengan kombinasi kinetin dan IAA menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap jumlah daun dengan semakin bertambahnya umur biakan. Pengaruh yang nyata terlihat pada ukuran daun. Penambahan kinetin menyebabkan ukuran daun menjadi kecil, makin tinggi konsentrasi kinetin makin kecil ukuran daun. Pertambahan konsentrasi IAA tidak mempengaruhi ukuran daun yam (Tabel 6). Tampaknya kombinasi kinetin dengan IAA pada konsentrasi yang diberikan belum dapat meningkatkan aktivitas kinetin dalam meningkatkan jumlah daun.

Penelitian media penyimpanan yam menggunakan zat penghambat paclobutrazol memperlihatkan bahwa makin tinggi konsentrasi paclobutrazol maka makin pendek biakan dan daun makin kecil bahkan pada konsentrasi 5 mg/l daun seperti roset. Sebaliknya dengan bertambahnya konsentrasi paclobutrazol maka makin banyak jumlah daun biakan yam (Gambar 3). Paclobutrazol menghambat sintesis GA₃ sehingga ruas batang memendek tetapi jumlah bukannya bertambah dan tentunya jumlah daun akan meningkat



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi BA terhadap pembentukan daun/biakan dan cabang/biakan yam pada umur 2 dan 4 bulan

Tabel 6. Pengaruh zat pengatur tumbuh kinetin dan IAA terhadap jumlah daun/biakan dan besaran daun yam

Media (mg/l)	Jumlah daun/biakan		Besaran daun
	2 bulan	4 bulan	
K 0 + IAA 0	2,83	5,17	Besar
K 0 + IAA 0,5	3,17	5,83	Besar
K 0 + IAA 1,0	3,33	6,17	Besar
K 1 + IAA 0	3,50	6,00	Sedang
K 1 + IAA 0,5	3,17	5,50	Sedang
K 1 + IAA 1,0	3,50	6,00	Sedang
K 2 + IAA 0	3,67	6,33	Kecil
K 2 + IAA 0,5	4,00	5,55	Kecil
K 2 + IAA 1,0	2,83	5,83	Kecil

K = kinetin

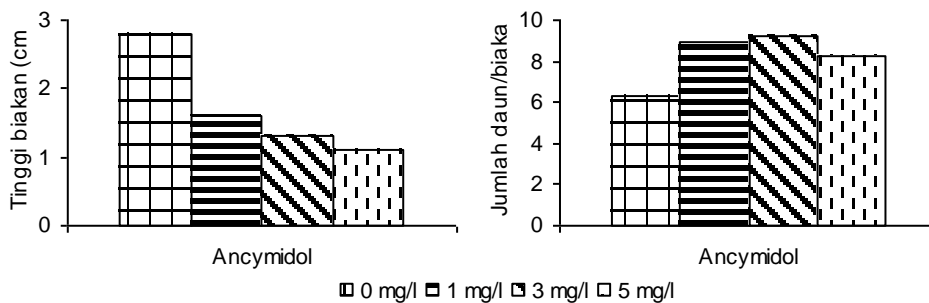
pula. Pengamatan dilakukan pada umur 4,5 bulan sehingga masih belum dapat disimpulkan konsentrasi berapa yang paling optimal untuk penyimpanan yam. Masih perlu pengamatan selanjutnya untuk melihat pada konsentrasi berapa biakan yam masih dapat bertahan hidup dan berapa lama dapat disimpan pada konsentrasi tersebut.

Penambahan ancymidol juga memperpendek biakan, makin tinggi konsentrasi ancymidol maka makin pendek biakan yam. Demikian juga dengan besarnya daun, makin tinggi konsentrasi ancymidol, maka daunnya makin kecil. Penambahan ancymidol juga memperbanyak jumlah daun. Pengamatan pada umur empat bulan memperlihatkan pertumbuhan yang terhambat dengan penambahan ancymidol (Gambar 4). Diharapkan dengan pertumbuhan yang terhambat, daun yang kecil, dan perpendekan buku dapat memperpanjang masa simpan. Maka perlu diamati sampai berapa lama yam dapat disimpan dengan media ini.

Percobaan media penyimpanan menggunakan stabilisator osmotik manitol baru berjalan 1 bulan sehingga masih belum terlihat pengaruhnya.



Gambar 3. Pengaruh paclobutrazol terhadap tinggi biakan dan pembentukan daun/biakan pada masa simpan yam 4,5 bulan



Gambar 4. Pengaruh ancymidol terhadap tinggi biakan dan pembentukan daun/biakan pada masa simpan yam 4 bulan

Perlu waktu paling sedikit 4 bulan sebelum terlihat pengaruh dari perlakuan.

KESIMPULAN

1. Pra kultur dengan media VKM + sukrosa + manitol menghasilkan jaringan yang tetap berwarna hijau dan tegar setelah perendaman di krioprotektan selama 16 jam.
2. Untuk mengurangi pelayuan daun ubi kayu dapat dilakukan dengan menggunakan media dasar DKW + glutamin.
3. Multiplikasi yam dapat dilakukan dengan menambahkan kinetin 2 mg/l atau BA 1 mg/l pada media dasar MS.
4. Pada media penyimpanan, bertambahnya konsentrasi paclobutrazol dan ancymidol menyebabkan biakan makin pendek, daun makin mengecil, dan jumlah daun bertambah.

DAFTAR PUSTAKA

- Acedo, V.Z. 1995.** Meristem culture and *in vitro* maintenance of Philippine cassava. *In* Proceedings of the second International Scientific Meeting, Bogor, Indonesia 22-26 August 1994. The Cassava Biotechnology Network, Vol I. Working Document No. 150. CIAT.
- Ashmore, S.E. 1997.** Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. IPGRI, Queensland, Australia. p. 25-26.
- Bajaj, Y.P.S. 1979.** Technology and prospects of cryopreservation of germplasm. *Euphytica* 28:267-285.
- Bessembinder, J.J.E., G. Staristsky, and E.A. Zandvoort. 1993.** Longterm *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 33:121-127.
- Chee, R.P., J.R. Schultheis, and D.J. Cantliffe. 1992.** Micropropagation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 19:107-117.
- Kartha, K.K. 1985.** Meristem culture and germplasm preservation. *In* Kartha, K.K. (Ed). *Cryopreservation of Plant Cells and Organics*. Cre Press. Florida. p. 116-134.
- Love, S.L., B.B. Rhodes, and J.W. Moyer. 1987.** Meristem-tip culture and virus indexing of sweet potatoes. IBPGR. Rome.
- Mandal, B.B. and K.P.S. Chandel. 1996.** Conservation of genetic diversity in sweet potato and yams using *in vitro* strategies. *In* Kurup, G.T., M.S. Palaniswami, V.P. Potty, G. Padmaja, S. Kabeerathumma, and S.V. Pillai (Eds). *Tropical Tuber Crops : Problems, Prospects and Future Strategies*. Sci. Publ. Inc. India.

- Martin, M.L., Y. Gogorcena, J. Ortiz, and N. Duram-Vila. 1993.** Recovery of whole plants of sweet orange from somatic embryos subjected to freezing thawing treatments. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 34:27-33.
- Marschner, H. 1986.** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. London. 674 p.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Prasetyorini. 1999.** Preservasi *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz. melalui teknik kultur *in vitro*. Seminar Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor, 16 Desember 1999.
- Purnamaningsih, R., I. Mariska, E. Gati, dan S. Rahayu. 1998.** Proliferasi tunas dan penekanan masalah penguningan daun sebagai usaha pelestarian tumbuhan. *Buletin Plasma Nutfah* 3(1):1-7.
- Reinhold, P.J., E.W.M. Schrijnemoekers, F. Von Iven, and J.W. Kijrc. 1995.** Vitrification and a heat-shock treatment improved cryopreservation of tobacco cell suspensions compared to two-step freezing. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 42:261-267.
- Sakai, A.S., Kobayashi, and I. Oiyama. 1990.** Cryopreservation of nucellar cells of Havee orange (*Citrus sinensis* Osb.) by simple freezing method. *Plant Sci.* 74:243-248.
- Sakai, A. 1993.** Cryogenic strategies for survival of plant cultured cells and meristems cooled to -196°C. *In* Cryopreservation of Plant Genetic Resources. Japan International Cooperation Agency. p. 1-25.
- Sunarlim, N., Minantyorini, dan W.H. Adil. 1999.** Penyimpanan ubi jalar secara *in vitro* dengan pertumbuhan minimal. *Buletin Plasma Nutfah* 5(1):1-5.
- Taylor, P.W.J. and S. Dukie. 1993.** Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum* spp. hybrid germplasm. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 34:217-222.
- Towill, L.E. and R.L. Jarret. 1992.** Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) shoot tips by vitrification. *Plant Cell Report* 11:175-178.
- Unnikrishnan, M., N.G. Nair, and G.G. Nayar. 1992.** Preliminary studies on the conservation of germplasm of tuber crops through *in vitro* cultures. *In* Subba *et al.* (Eds.). *New Trends in Biotechnology*. Oxford and IBH Publ. Co. PVT. LTD. New Delhi, India.
- Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, N.A. Mattjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, dan A. Ernawati. 1992.** *Bioteknologi Tanaman*. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.

Withers, L.A. and J.T. Williams. 1985. Research on longterm storage and exchange of *in vitro* plant germplasm. *In* Biotechnology in International Agric. Res. Proceedings of IARC and Biotechnology. p. 11-24