

Pengaruh Beberapa Krioprotektan terhadap Keberhasilan Penyimpanan Ubi-ubian secara Kriopreservasi

Ika R. Tambunan, Novianti Sunarlim, Ika Mariska, dan Mia Kosmiatin

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Penyimpanan dengan teknik kriopreservasi merupakan penyimpanan *in vitro* yang berpotensi untuk menyimpan plasma nutfah dalam jangka panjang. Penelitian dilakukan pada TA 2002 yang terdiri dari dua kegiatan, yaitu (1) krio-preservasi ubi kayu (*Manihot utilissima*) yang ditujukan untuk mengetahui durasi prakultur yang optimal dan untuk mengetahui pengaruh beberapa macam krioprotektan dalam beberapa macam durasi *loading* dan (2) kriopreservasi yam (*Dioscorea alata*) yang ditujukan untuk mengetahui pengaruh beberapa macam media prakultur dan durasi prakultur yang optimal. Pada percobaan kriopreservasi ubi kayu, prakultur dilakukan pada media MS dengan penambahan sukrosa 0,3 M dengan durasi 1, 2, dan 4 hari. *Loading* dilakukan selama 10, 20, dan 30 menit. Larutan krioprotektan yang diujikan adalah PVS1, PVS2, dan PVS3. Pada percobaan kriopreservasi yam, prakultur dilakukan pada media MS dengan taraf sukrosa 0,3; 0,5; dan 0,7 M dengan penambahan asam sitrat 100 ppm. Hasil percobaan kriopreservasi ubi kayu menunjukkan bahwa durasi prakultur yang optimal selama 4 hari. Kombinasi perlakuan prakultur 4 hari dan *loading* selama 20 menit merupakan perlakuan terbaik untuk semua jenis krioprotektan yang diujikan. Larutan PVS3 (50% gliserol + 50% sukrosa dalam media MS) mempunyai daya hambat yang paling rendah terhadap pertumbuhan kultur. Hasil percobaan kriopreservasi yam menunjukkan bahwa kultur yam mempunyai toleransi yang cukup tinggi terhadap taraf sukrosa tinggi hingga 0,7 M pada perlakuan prakultur.

Kata kunci: Kriopreservasi, *Manihot utilissima*, *Dioscorea alata*

ABSTRACT

Cryopreservation is potential *in vitro* method for long term preservation of germplasm. The research was conducted in 2002 and divided into two experiments. The first experiment was cryopreservation of cassava (*Manihot utilissima*) to obtain optimum preculture duration and to study the effect of several cryoprotectants in several loading times. The second experiments was cryopreservation of yam (*Dioscorea alata*) to study the effect of several preculture mediums and to obtain the optimal preculture duration. In the cassava cryopreservation experiment, preculture was conducted in the MS medium containing 0.3 M of sucrose for 1, 2, and 4 days of preculture duration. Loading was conducted for 10, 20, and 30 minutes. Cryoprotectant solutions that be used were PVS1, PVS2, and PVS3. In the yam cryopreservation experiment, preculture was conducted in MS medium containing 100 ppm of citric acid and supplemented with sucrose at level 0.3, 0.5, and 0.7 M. Result showed that the optimum preculture duration of cassava cryopreservation was 4 days. The combination of 4 days of preculture and 20 minutes of loading showed the best result for all kind of cryoprotectants that be used. The PVS3 (50% gliserol + 50% sucrose in MS media) gave the lowest inhibition of cultures growth. The yam cryopreservation experiment showed that yam culture had high tolerance to

high level of sucrose to 0.7 M in the preculture treatment.

Key words: Cryopreservation, *Manihot utilissima*, *Dioscorea alata*

PENDAHULUAN

Kriopreservasi adalah salah satu metode penyimpanan plasma nutfah secara *in vitro* yang sangat potensial untuk penyimpanan jangka panjang. Dengan metode tersebut, masalah penyimpanan secara konvensional dapat ditanggulangi seperti kehilangan genotipe akibat cekaman lingkungan baik biotik maupun abiotik. Selain itu, permasalahan dalam penyimpanan teknik *in vitro* dengan pertumbuhan minimal dapat diatasi karena interval subkultur dapat ditekan hingga 15 tahun. Penyimpanan plasma nutfah secara *in vitro* mulai digalakkan sejak tahun 1980 oleh International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) terutama untuk jenis dengan aksesori yang sangat kaya keragamannya. Ubi kayu merupakan plasma nutfah yang tinggi keragamannya. Di Balitbio, ubi kayu telah terkaraterisasi dalam *database* sebanyak 434 aksesori (Somantri *et al.*, 2001) sedangkan yam belum terkaraterisasi dalam *database*.

Secara garis besar, metode kriopreservasi terdiri dari 5 tahap, yaitu (1) pra-perlakuan/prakultur, (2) dehidrasi jaringan, (3) pembekuan dalam nitrogen cair, (4) *thawing* (pelelehan), dan (5) *recovery* bahan tanaman setelah penyimpanan. Masing-masing tahapan tersebut dipengaruhi oleh berbagai faktor yang sangat menentukan keberhasilan kriopreservasi.

Pada tahap pembekuan perlu diperhatikan pemilihan jaringan tanaman yang akan dibekukan dan krioprotektan yang akan melindungi jaringan tanaman dari pembentukan kristal es di dalam sel atau di ruang antarsel. Berdasarkan penelitian Escobar *et al.* (2000), kultur ubi kayu dapat disimpan secara kriopreservasi dengan teknik dua tahap pembekuan. Menurut Charoensub *et al.* (1999), kultur ubi kayu dapat disimpan dengan teknik vitrifikasi. Kultur yam juga dapat disimpan dengan teknik vitrifikasi (Ng dan Ng, 2000). Teknik vitrifikasi dilaporkan lebih mudah dan lebih murah daripada teknik pembekuan dua tahap.

Untuk melindungi jaringan ada dua golongan krioprotektan yang dapat digunakan, yaitu (1) krioprotektan yang dapat masuk ke dalam sel (intraselular) seperti dimethyl sulfoksida (DMSO) dan polyethylene glykol (PEG), dan (2) krioprotektan yang dapat masuk ke dalam ruang antarsel (ekstraselular) seperti sukrosa dan sorbitol (Sakai *et al.*, 1993). Menurut Charoensub *et al.* (1999), krioprotektan PVS2 dapat melindungi jaringan setelah pembekuan dalam nitrogen cair dengan tingkat daya hidup dan regenerasinya cukup tinggi, sedangkan pada percobaan kriopreservasi pada yam, tingkat daya hidup dan regenerasi yang dihasilkan masih sangat rendah (Ng dan Ng, 2000).

Tahapan *thawing* merupakan tahapan yang kritis dalam keberhasilan kriopreservasi. Dalam tahap ini diperlukan suatu teknik peningkatan suhu

yang dapat melindungi jaringan dari pecahnya sel akibat kenaikan suhu yang terlalu cepat (Martin *et al.*, 1993) atau rekristalisasi pada sel yang telah di-*thawing*.

Tahap yang juga menentukan keberhasilan teknik ini adalah mampu tidaknya meregenerasikan jaringan yang sudah disimpan, sehingga penguasaan teknik regenerasi sangat mutlak dikuasai sebelum dilakukan kriopreservasi. Media regenerasi yang optimum untuk kultur yam adalah media dasar MS dengan penambahan kinetin 2 mg/l atau BA 1 mg/l (Sunarlim *et al.*, 2001). Media regenerasi yang optimum dapat meregenerasikan dan menekan pelayuan pada kultur ubi kayu adalah media DKW ditambah dengan BA pada konsentrasi 3-10 mg/l dan glutamin 100 mg/l (Kosmiatin *et al.*, 2001). Namun demikian, daya regenerasi kultur ubi kayu akan lebih baik apabila ditumbuhkan pada media MS inorganik dengan penambahan 100 mg/l mio-inositol, 1 mg/l thiamine HCl, 0,02 mg/l BA, 0,1 mg/l GA, dan 0,01 mg/l NAA pada sukrosa 3% dengan pH 5,6 (Charoensub *et al.*, 1999).

Tujuan dari penelitian ini ialah mendapatkan metode prakultur yang optimal dan formulasi krioprotektan yang efektif bagi ubi kayu dan yam untuk penyimpanan dengan teknik kriopreservasi.

BAHAN DAN METODE

Kriopreservasi Ubi Kayu

Metode kriopreservasi ubi kayu yang digunakan adalah teknik vitrifikasi yang merupakan modifikasi teknik dari Charoensub *et al.* (1999). Untuk mengkondisikan jaringan yang akan dibekukan, eksplan yang berupa tunas pucuk ubi kayu yang berukuran $\pm 0,5$ cm dikulturkan pada media prakultur. Perlakuan prakultur yang diujikan adalah waktu/lama inkubasi eksplan, yaitu selama 1, 2, dan 4 hari dalam media MS dengan Sukrosa 0,3 M. Setelah prakultur, eksplan direndam dalam larutan *loading* (LS) selama 10, 20, dan 30 menit. Larutan LS merupakan media MS dengan penambahan gliserol 2 M dan sukrosa 0,4 M. Setelah direndam dalam larutan LS, eksplan direndam pada larutan krioprotektan selama 10 menit. Larutan krioprotektan yang diujikan adalah PVS1 yang terdiri dari 22% gliserol + 13% propilen glikol + 13% etilen glikol + 6% DMSO dalam media MS dengan taraf sukrosa 3%, PVS2 yang terdiri dari gliserol 30% + etilen glikol 15% + DMSO 15% dalam media MS dengan taraf sukrosa 0,4 M, dan PVS3 yang terdiri dari 50% gliserol + 50% sukrosa dalam media MS (Sakai, 1993).

Peubah yang diamati adalah jumlah eksplan yang bertahan hidup, bertunas, berakar, dan berkalus serta tinggi kultur dan jumlah daun.

Kriopreservasi Yam

Percobaan kriopreservasi pada yam dilakukan untuk tahap prakultur. Eksplan yang digunakan berupa mata tunas pucuk dari biakan *in vitro* yam yang di-subkultur setiap 2-4 minggu dalam media MS dengan penambahan

kinetin 2 mg/l. Media dasar yang digunakan pada saat prakultur adalah media MS dengan penambahan asam sitrat 100 ppm. Perlakuan prakultur yang akan diujikan adalah kombinasi perlakuan taraf sukrosa dengan lama waktu inkubasi dalam media tersebut. Taraf sukrosa yang dicobakan adalah 0,3; 0,5; dan 0,7 M sedangkan waktu inkubasi selama 1, 3, 5, dan 7 hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kriopreservasi Ubi Kayu

Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kriopreservasi adalah perlakuan prakultur. Dilaporkan bahwa perlakuan prakultur efektif meningkatkan keberhasilan hidup eksplan setelah dibekukan. Prakultur menyebabkan terjadinya akumulasi gula yang dapat meningkatkan stabilitas membran sel pada kondisi terdehidrasi (Takagi, 2000). Hasil percobaan prakultur disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan data yang diperoleh dapat diketahui bahwa durasi prakultur hingga 4 hari tidak mempengaruhi daya hidup kultur ubi kayu, bahkan persentase kultur yang bertunas tetap tinggi (75-100%). Persentase kalus terendah (28,5%) dihasilkan dari perlakuan prakultur selama 4 hari. Hasil percobaan juga menunjukkan bahwa semakin lama durasi prakultur cenderung menyebabkan semakin menurunnya tinggi kultur dan jumlah daun.

Penggunaan krioprotektan sebelum pembekuan dimaksudkan untuk mencapai titik transisi sebelum terjadi nukleasi es. Pada kondisi seluler, titik tersebut tercapai pada suhu sekitar -100°C sedangkan kristal es terbentuk jauh sebelum suhu tersebut tercapai (Blakesley, 1996). Dalam hal ini, konsentrasi krioprotektan dan waktu perendaman harus diperhatikan. Pada kriopreservasi ubi jalar, perendaman secara gradual dapat mengatur kondisi kultur yang akan disimpan karena dehidrasi terjadi secara perlahan-lahan (Towill dan Jarret, 1992). Namun perendaman kultur dalam larutan LS dapat menggantikan perendaman secara gradual, bahkan efektivitasnya telah banyak dilaporkan. Larutan LS dilaporkan efektif dapat meminimalkan efek negatif dari larutan vitrifikasi, khususnya bagi spesies yang relatif sensitif terhadap PVS2 seperti taro, lily, dan wasabi (Takagi *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1994; 1995). Selama eksplan diinkubasikan ke dalam larutan LS, beberapa gliserol dapat masuk ke dalam sitosol. Efek proteksi dari larutan LS merupakan hasil akumulasi krioprotektan sitosolik selama prakultur dan efek proteksi terhadap plasmolisis (Takagi, 2000). Selain itu, keberadaan larutan

Tabel 1. Pengaruh durasi prakultur dalam media MS dengan penambahan sukrosa 0,3 M terhadap pertumbuhan kultur ubi kayu umur 2 minggu

Prakultur (hari)	Hidup (%)	Bertunas (%)	Berkalus (%)	Tinggi kultur (mm)	Jumlah daun
1 hari	100	75	100	3,6	1,6
2 hari	100	100	100	2,4	1,0
4 hari	100	100	28,5	2,0	1,1

LS di dalam ruang periprotoplasmik sel yang mengalami plasmolisis dapat menghindarkan terjadinya stres mekanik akibat dehidrasi. Oleh karena itu, pada percobaan ini kultur direndam dalam larutan *loading* dalam waktu tertentu sebelum direndam dalam krioprotektan.

Hasil percobaan perendaman dalam larutan vitrifikasi menunjukkan bahwa kultur mempunyai daya hidup yang cukup tinggi (75-100%) pada semua jenis krioprotektan, durasi prakultur dan durasi *loading* yang diujikan. Tinggi kultur dan jumlah daun pada kultur setelah perendaman dalam larutan vitrifikasi berkisar antara 0,8-2,6 mm dan 0,4-1,4 untuk PVS1, 0,8-1,8 mm dan 0,2-1,0 untuk PVS2 serta 1,0-3,0 mm dan 0,4-1,8 untuk PVS3. Larutan PVS2 tampak bersifat lebih menghambat pertumbuhan kultur sedangkan larutan PVS3 tampak paling rendah penghambatan pertumbuhannya. Hal ini mungkin disebabkan molaritas larutan PVS2 paling tinggi, sebaliknya larutan PVS3 mempunyai molaritas yang paling rendah. Menurut Towill dan Jarret (1992), krioprotektan berpotensi menyebabkan kerusakan yang diakibatkan dari efek fitotoksisitas komponen zat terlarut atau efek osmotik bahan terhadap viabilitas sel.

Tabel 2. Pengaruh berbagai macam krioprotektan terhadap pertumbuhan kultur ubi kayu umur 2 minggu

Jenis larutan krioprotektan	Durasi prakultur	Durasi <i>loading</i> (menit)	Hidup (%)	Bertunas (%)	Berkalus (%)	Tinggi kultur (mm)	Jumlah daun
PVS1	1 hari	10'	100	100	100	1,8	1,4
		20'	100	80	100	1,4	0,6
		30'	100	60	60	1,2	1,0
	2 hari	10'	100	80	100	1,6	0,8
		20'	100	80	100	1,2	0,4
		30'	80	80	80	0,8	0,6
	4 hari	10'	75	75	75	2,0	1,3
		20'	100	100	60	2,6	0,8
		30'	100	100	60	1,6	1,4
PVS2	1 hari	10'	100	80	100	1,2	0,6
		20'	100	80	80	1,4	0,8
		30'	100	80	100	1,0	0,6
	2 hari	10'	100	40	100	0,8	0,8
		20'	100	80	100	1,2	0,8
		30'	80	60	80	0,8	0,2
	4 hari	10'	100	100	80	1,6	1,0
		20'	100	100	20	1,8	1,0
		30'	100	60	20	1,0	0,6
PVS3	1 hari	10'	100	100	60	2,2	1,2
		20'	100	100	100	2,0	1,8
		30'	100	60	60	1,0	0,8
	2 hari	10'	100	100	100	2,0	0,8
		20'	100	100	100	1,4	1,2
		30'	100	60	100	0,6	0,4
	4 hari	10'	100	80	60	2,4	0,6
		20'	100	100	60	3,0	1,6
		30'	100	100	80	1,4	0,8

PVS1 = 22% gliserol + 13% propilen glikol + 13% etilen glikol dalam media MS dengan taraf sukrosa 3%; PVS2 = 30% gliserol + 15% etilen glikol + 15% DMSO dalam media MS dengan taraf sukrosa 0,4 M; PVS3 = media MS + 50% gliserol + 50% sukrosa; *Loading* = media MS + gliserol 2 M + sukrosa 0,4 M

Pada semua jenis krioprotektan yang diujikan dapat diketahui bahwa durasi prakultur selama 4 hari dan durasi *loading* selama 20 menit merupakan perlakuan terbaik karena kultur mampu bertahan hidup dan mampu membentuk tunas dengan persentase yang tinggi, serta mempunyai tinggi kultur dan jumlah daun yang tinggi.

Kriopreservasi Yam

Pada percobaan pendahuluan diketahui bahwa kultur yam dapat mengalami pencoklatan/*browning* pada saat prakultur. Oleh karena itu, pada percobaan selanjutnya digunakan media dengan penambahan asam sitrat 100 ppm untuk mencegah pencoklatan tersebut. Penambahan asam sitrat 100 ppm dalam media dapat mengurangi pencoklatan sehingga pertumbuhan kultur menjadi lebih terpacu. Pencoklatan terjadi karena jaringan eksplan

mengeluarkan senyawa fenolik. Senyawa tersebut berpotensi menghambat pertumbuhan dan bahkan dapat ber-sifat toksik terhadap jaringan.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa kultur yam mempunyai toleransi yang cukup tinggi terhadap sukrosa bertaraf tinggi hingga 0,7 M (Tabel 3). Hal serupa dilaporkan oleh Mandal (2000) di mana kultur yam mampu bertahan hidup pada media prakultur dengan penambahan sukrosa 0,75 M selama 3-7 hari. Persentase kultur yang bertahan hidup dan bertunas berkisar antara 0 hingga 80% dan tidak satupun kultur yang membentuk kalus. Ini sangat menguntungkan karena variasi somaklonal dapat dihindari. Pembentukan kalus berpotensi menimbulkan variasi somaklonal. Dalam penyimpanan secara kriopreservasi, kestabilan genetik sangat diperhatikan dan diinginkan. Hasil percobaan tidak menunjukkan perubahan yang spesifik. Hal ini diduga karena eksplan yang digunakan mempunyai variasi yang cukup tinggi terutama dalam hal tingkat juvenilitas eksplan.

KESIMPULAN

Hasil percobaan kriopreservasi ubi kayu menunjukkan bahwa durasi prakul-tur yang optimal untuk kultur ubi kayu adalah 4 hari. Kombinasi perlakuan prakul-tur 4 hari dan *loading* selama 20 menit merupakan perlakuan terbaik untuk semua jenis krioprotektan yang diujikan. Larutan PVS3 (50% gliserol + 50% sukrosa dalam media MS) mempunyai daya hambat yang paling rendah terhadap pertumbuhan kultur.

Hasil percobaan kriopreservasi yam menunjukkan bahwa kultur yam mempunyai toleransi yang cukup tinggi terhadap taraf sukrosa tinggi hingga 0,7 M pada perlakuan prakultur.

DAFTAR PUSTAKA

Tabel 3. Pengaruh perlakuan prakultur pada berbagai taraf sukrosa dan durasi prakultur

Media prakultur	Durasi prakultur	Hidup (%)	Bertunas (%)	Berkalus (%)
MS + sukrosa 0,3 M + asam sitrat 100 ppm	1 hari	60	60	0
	3 hari	40	40	0
	5 hari	80	80	0
	7 hari	60	60	0
MS + sukrosa 0,5 M + asam sitrat 100 ppm	1 hari	40	40	0
	3 hari	80	80	0
	5 hari	20	20	0
	7 hari	40	40	0
MS + sukrosa 0,7 M + asam sitrat 100 ppm	1 hari	0	0	0
	3 hari	60	60	0
	5 hari	40	40	0
	7 hari	80	80	0

- Blakesley, D., N. Pask, G.G. Henshaw, and M.F. Fay. 1996.** Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: *In vitro* strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regulation* 20:11-16.
- Charoensub, R., S. Phansiri, A. Sakai, and W. Yongmanitchai. 1999.** Cryopreservation of cassava *in vitro*-grown shoot-tips cooled to -196°C by vitrification. *Cryo-Letters* 20:89-94.
- Escobar, R.H., D.Debouck, and W.M.Roca. 2000.** Development of cassava cryopreservation. *In* Engelmann, F. and H. Takagi. (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. IPGRI. Rome-Italy. p. 222-226.
- Kosmiatin, M., I. Mariska, N. Sunarlim, dan I. Roostika. 2001.** Kriopreservasi ubi jalar dan optimasi regenerasi ubi kayu dengan penekanan pelayuan. Laporan Hasil Penelitian TA 2001/2002. Balitbio, Bogor.
- Mandal, B.B. 2000.** Cryopreservation of yam apices: A comparative study with three different techniques. *In* Engelmann, F. and H. Takagi. (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. IPGRI. Rome-Italy. p. 233-237.
- 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.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada. 1994.** Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Report* 13:442-446.
- Matsumoto, T., A. Sakai, and K. Yamada. 1995.** Cryopreservation *in vitro*-grown apical meristems of lily by vitrification. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 41:237-241.
- Ng, SYC and N.Q. Ng. 2000.** Cryopreservation of cassava and yam shoot-tips by fast freezing. *In* Engelmann, F. and H. Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. IPGRI. Rome-Italy. p. 418-420.
- Sakai, A. 1993.** Cryopreservation of Plant Genetic Resources. JICA. Japan. 135 p.
- Sakai, A.S., Kobayashi, and I. Oiyama. 1993.** Cryopreservation of nucellar cells of Havee orange (*Citrus sinensis* Osb.) by simple freezing method. *Plant Sci.* 74:243-248.
- Somantri, I.H., S.A. Rais, T.S. Silitonga, S.G. Budiarti, Sutoro, Asadi, N. Zuraida, Minantyorini, Hadiatmi, L. Hakim, H. Kurniawan, D. Saptadi, T. Suhartini, dan M. Setyowati. 2001.** Pelestarian sumberdaya

genetik tanaman pangan. Makalah dalam Seminar Tahunan Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman II. Bogor, 30-31 Januari 2001.

- Sunarlim, N., Hadiatmi, S. Rahayu, dan I. Roostika. 2001.** Multiplikasi tunas tanaman ganyong dan yam untuk penyimpanan secara kultur *in vitro*. Laporan Hasil Penelitian TA 2000/2001. Balitbio, Bogor.
- Takagi, H. 2000.** Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. *In* Engelmann, F. and H. Takagi. (*Eds.*). Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. IPGRI. Rome-Italy. p. 178-193.
- Takagi, H., N.T. Thinh, O.M. Islam, T. Senboku, and A. Sakai. 1997.** Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. Plant Cell Report 16:594-599.
- Towill, L.E. and R.L. Jarret. 1992.** Cryopreservation of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) shoot tips by vitrification. Plant Cell Report 11:175-178.