

Kriopreservasi Ubi Jalar dan Optimasi Regenerasi Ubi Kayu dengan Penekanan Pelayuan

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 terdiri dari 2 kegiatan, yaitu (1) kriopreservasi ubi jalar dan ubi kayu dan (2) regenerasi dan penekanan pelayuan pada ubi kayu. Pada percobaan kriopreservasi ubi jalar, untuk pratumbuh dan prakultur dicoba kombinasi perlakuan media (MS dan MS termodifikasi/ MSC) dan suhu pada saat inkubasi (suhu dingin dan suhu ruang). Pada prakultur digunakan media dasar dengan penambahan etilen glikol atau DMSO pada taraf 3 atau 1,5%. Perendaman dalam krio-protektan dilakukan secara gradual. *Thawing* dilakukan dengan metode *thawing* cepat. Percobaan kriopreservasi pada ubi kayu baru dilakukan pada tahap pra-kultur, yaitu inkubasi eksplan yang merupakan mata tunas aksilar dalam media dengan penambahan sukrosa 0,3 M selama 2-5 hari. Pada percobaan regenerasi dan penekanan pelayuan ubi kayu dicoba 2 media dasar (MS dan DKW) dengan penambahan kinetin atau BA yang dikombinasikan dengan glutamin. Hasil percobaan menunjukkan bahwa perlakuan pratumbuh dan prakultur untuk ubi jalar optimum pada penggunaan media MS pada suhu ruang kultur. Penggunaan etilen glikol lebih baik daripada DMSO. Eksplan ubi jalar dapat bertahan hidup dan beregenerasi setelah direndam dalam larutan PVS2 walaupun persentasenya lebih rendah dibandingkan dengan pengaruh pada tahap perlakuan sebelumnya. Setelah dibekukan dalam nitrogen cair, eksplan tidak bertahan hidup. Hasil pengamatan visual terhadap eksplan ubi kayu yang telah diperlakukan prakultur menampilkan bahwa eksplan terlihat hijau dan segar yang menandakan bahwa eksplan dapat bertahan hidup. Penggunaan media dasar MS dan DKW tidak memberikan perbedaan pada pertumbuhan dan penekanan pelayuan tunas ubi kayu. Media optimasi terbaik untuk pertunasan ialah media DKW dengan penambahan BA 3-10 mg/l, glutamin 100 mg/l, dan NAA 0,001 mg/l.

Kata kunci: Kriopreservasi, *Ipomea batatas*, *Manihot utilissima*

ABSTRACT

Conservation with cryopreservation is an *in vitro* culture technique with highly potential for germplasm long conservation. The experiments consisted of 2 activities, the first activity was cryopreservation for sweet potato and cassava and the second activity was the regeneration of cassava. For the sweet potato cryopreservation experiment, combination of base media (MS and modification MS) and incubation temperatures (cold and room temperatures) was applied for pregrowth and preculture treatments. For preculture treatment, ethylene glycol or DMSO at the rates of 1.5 and 3% was applied to the base media. Exposure in the cryoprotectant was done gradually. Thawing was using rapid thawing. For cassava cryopreservation experiment, preculture treatment was done in the base media supplemented with sucrose at the rate of 0.3 M for 2-5 days. In the experiment of cassava regeneration, the base media (MS and DKW) was combined with Kinetin or BA and applied with glutamin. Result of the experiments showed that the best treatment for pregrowth and preculture of sweet potato was MS medium with room

temperature. Using ethylene glycol was better than DMSO for preculture treatment. Explants of sweet potato survived and regenerated well after exposure to PVS2 although the percentage was lower than before the exposure. After the exposure to liquid nitrogen, the explants could not survive. The visual observation to cassava preculture treatment, the explants was still green and vigor. Base media of MS and DKW gave the same affect on the cassava growth and reduced of senescence. The best media for cassava multiplication was DKW with application of BA 3-10 mg/l, glutamin 100 mg/l, and NAA 0.001 mg/l.

Key words: Cryopreservation, *Ipomea batatas*, *Manihot utilissima*

PENDAHULUAN

Kriopreservasi adalah salah satu metode penyimpanan plasma nutfah secara *in vitro* yang sangat potensial untuk penyimpanan dalam jangka waktu yang lama. Metode ini dapat menanggulangi masalah penyimpanan secara konvensional seperti kehilangan genotipe, cekaman lingkungan. 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 jalar dan ubi kayu merupakan plasma nutfah yang tinggi keragamannya, di Balitbio telah terkarakterisasi dalam database sebanyak 809 aksesori ubi jalar dan 434 aksesori ubi kayu (Hanarida *et al.*, 2001). Baru sekitar 150 aksesori ubi jalar yang sudah disimpan secara *in vitro* dengan pertumbuhan minimal, tetapi masih menghadapi hambatan subkultur yang masih berkisar 1 tahun. Hambatan lain pada pertumbuhan minimal ubi jalar adalah menurunnya daya regenerasi ubi jalar setelah disimpan 1 tahun, sehingga harus dilakukan pemulihan terlebih dahulu sebelum disimpan kembali (Sunarlim *et al.*, 1999). Penyimpanan ubi kayu secara *in vitro* masih menghadapi masalah pelayuan pada biakan yang disimpan sehingga masa simpan masih singkat.

Metode kriopreservasi terdiri dari 5 tahap, yaitu (1) prakultur, (2) dehidrasi jaringan, (3) pembekuan bahan tanaman yang akan disimpan, (4) *thawing* (pelelehan), dan (5) regenerasi bahan tanaman setelah penyimpanan. Masing-masing tahap 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. Dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa tunas satu buku yang dienkapsulasi bertahan hidup setelah diperlakukan dengan krioprotektan. 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 glikol (PEG) dan (2)

krioprotektan yang dapat masuk ke dalam ruang antarsel (ekstraselular) seperti sukrosa dan sorbitol (Sakai *et al.*, 1993).

Tahapan *thawing* merupakan tahapan yang kritis dalam keberhasilan krio-preservasi. 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 diperlukan sebelum dilakukan kriopreservasi.

Regenerasi ubi jalar sudah dikuasai pada penelitian tahun sebelumnya, sementara untuk ubi kayu regenerasinya masih dihambat oleh pelayuan yang sangat tinggi. Untuk mengurangi pelayuan digunakan media dasar yang kaya dan dengan meningkatkan kandungan N serta penambahan sitokinin untuk lebih memacu pembentukan tunas adventif.

Tujuan dari penelitian ini ialah untuk mendapatkan metode kriopreservasi pada ubi jalar dan praperlakuan ubi kayu serta optimasi regenerasi ubi kayu dengan penekanan pelayuan.

BAHAN DAN METODE

Kriopreservasi Ubi Jalar

Perlakuan Pratumbuh

Untuk mengetahui pengaruh media tumbuh dan suhu pada saat inkubasi terhadap daya hidup dan regenerasi eksplan (mata tunas aksilar) ubi jalar maka di-terapkan perlakuan pratumbuh. Perlakuan pratumbuh meliputi 3 perlakuan, yaitu (1) perlakuan pada suhu rendah (kulkas $\pm 5^{\circ}\text{C}$) dengan media MS, (2) perlakuan pada suhu rendah (kulkas $\pm 5^{\circ}\text{C}$) dengan media MS termodifikasi (MSC = media MS dengan kandungan NH_4NO_3 setengah kali lipat), dan (3) perlakuan pada suhu ruang dengan media MS. Perlakuan tersebut dikombinasikan dengan taraf sukrosa 3, 4, 6, dan 8%. Pada semua perlakuan, eksplan diinkubasikan selama 1 minggu.

Perlakuan Prakultur

Perlakuan pratumbuh yang memberikan hasil lebih baik diterapkan pada tahap percobaan berikutnya, yaitu pada perlakuan prakultur. Jadi, perlakuan prakultur merupakan kombinasi dari perlakuan pratumbuh dan perlakuan pada saat prakultur itu sendiri, yaitu inkubasi eksplan selama 2 hari pada suhu rendah dalam media MSC dengan penambahan etilen glikol 1,5 dan 3% atau DMSO 1,5 dan 3%.

Perlakuan Perendaman dalam Krioprotektan

Pada percobaan ini, krioprotektan yang digunakan adalah PVS2 (Sakai, 1993). Perlakuan perendaman dalam krioprotektan dilakukan secara gradual yang merupakan modifikasi teknik yang pernah dilakukan oleh Towill dan Jarret (1992). Perlakuan tersebut berturut-turut adalah perendaman eksplan dalam larutan PVS2 20% selama 60 menit, 40% selama 30 menit, 60% selama 10 menit, dan 80% selama 5 menit.

Perlakuan Pembekuan Jaringan

Setelah perendaman dalam krioprotektan, eksplan direndam dalam nitrogen cair selama 1 jam lalu dilelehkan (*thawing*) pada suhu 30°C berangsur-angsur hingga suhu 22°C selama 30 menit dalam media MS dengan sukrosa 1,2 M. Selanjutnya, eksplan disubkultur pada media MS dengan penambahan kinetin 1 mg/l dan sukrosa pada taraf 2%.

Peubah yang diamati adalah persentase eksplan hidup, bertunas, berakar, dan berkalus serta penampakan visual kultur.

Kriopreservasi Ubi Kayu

Pada ubi kayu tidak dilakukan perlakuan pratumbuh seperti pada ubi jalar. Tunas dari media optimasi langsung ditanam pada media prakultur, yaitu media dengan penambahan sukrosa 0,3 M dengan waktu inkubasi selama 2-5 hari. Setelah itu, eksplan dipindahkan ke dalam media optimasi.

Pengamatan dilakukan terhadap persentase eksplan yang hidup dan regenerasi setelah prakultur serta penampakan visual kultur.

Penekanan Pelayuan dan Optimasi Regenerasi Ubi Kayu

Bahan tanaman yang digunakan adalah tunas *in vitro* ubi kayu yang ditumbuhkan pada medium MS padat tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Tunas satu buku diisolasi kemudian ditumbuhkan pada media penekanan pelayuan dengan media dasar MS dan DKW dengan penambahan NAA 0,001 mg/l, BAP atau kinetin 0,1 mg/l, dan sumber N tambahan (AgNO_3 atau glutamin).

Tunas dari media penekanan pelayuan ditanam kembali pada media MS dengan penambahan BAP (1-10 mg/l), NAA 0,001 mg/l, dan glutamin 100 mg/l.

Pengamatan dilakukan pada jumlah tunas, buku, daun, daun layu, tinggi tanaman, pembentukan kalus, dan akar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kriopreservasi Ubi Jalar

Semua tahap percobaan kriopreservasi dilakukan kembali dengan maksud untuk mengetahui perlakuan yang memberikan hasil yang optimal pada setiap tahapan. Selain itu, dapat diketahui juga pengaruh perlakuan sebelumnya terhadap hasil dari perlakuan berikutnya.

Tabel 1. Daya recovery eksplan mata tunas aksilar 4 minggu setelah perlakuan pratumbuh

Suhu dan media	Taraf sukrosa (%)	Eksplan (%)			
		Hidup	Bertunas	Berakar	Membentuk kalus
CH K, MS	3	40,0	0,0	0,0	0
	4	90,0	0,0	0,0	0
	6	87,5	0,0	0,0	0
	8	60,0	0,0	0,0	0
CH K, MSC	3	75,0	40,0	0,0	0
	4	75,0	50,0	0,0	0
	6	60,0	60,0	0,0	0
	8	50,0	25,0	0,0	0
nCH, MS	3	100,0	40,0	20,0	0
	4	100,0	60,0	0,0	0
	6	100,0	80,0	0,0	0
	8	100,0	0,0	0,0	0

CH K = *cold-hardening* pada kulkas, nCH = *non cold-hardening* pada ruang kultur, MS = media MS, MSC = media MS termodifikasi.

Pada tahap pratumbuh, perlakuan *cold-hardening* dimaksudkan untuk menginduksi toleransi sumber eksplan terhadap stress suhu rendah dan kekeringan. Perlakuan demikian pernah berhasil diterapkan pada tanaman lily (Matsumoto *et al.*, 1995) dan strawberry (Hirai *et al.*, 1998). Namun demikian, perlakuan *cold-hardening* terhadap sumber eksplan ubi jalar justru menyebabkan penurunan tingkat survival dan regenerasi eksplan (Tabel 1). Penggunaan sukrosa pada konsentrasi yang lebih tinggi dapat meningkatkan daya hidup eksplan. Menurut Bernard *et al.* (1975), sukrosa merupakan senyawa yang dapat melindungi sel dari stress suhu rendah dan kekeringan di mana tingkat proteksinya tergolong cukup tinggi dibandingkan dengan senyawa lain seperti manitol. Namun demikian, taraf sukrosa yang tinggi (8%) tampak memberikan pengaruh terhadap penurunan daya hidup jika dibandingkan dengan taraf sukrosa 4 dan 6%. Taraf sukrosa tersebut memberikan efek negatif sebagai akibat dari efek osmotik pada media tumbuh eksplan ubi jalar. Tingkat regenerasi eksplan dapat ditingkatkan dengan menggunakan media MS yang telah dimodifikasi, yaitu media MSC dengan kandungan NH_4NO_3 setengah kali dari media dasar MS. Respon terbaik dihasilkan dari perlakuan *non cold-hardening* pada media MS, yaitu dengan persentase jaringan hidup masing-masing sebesar 100% dan persentase eksplan bertunas berkisar antara 0-80% (Tabel 1). Secara visual, eksplan yang diperlakukan pratumbuh tidak menampakkan kelainan morfologi.

Perlakuan prakultur telah dilaporkan efektif dapat meningkatkan keberhasilan hidup eksplan setelah dibekukan. Prakultur menyebabkan terjadinya akumulasi gula yang dapat meningkatkan stabilitas membran sel pada kondisi terdehidrasi (Takagi, 2000). Etilen glikol, DMSO, dan sukrosa digolongkan ke dalam senyawa krioprotektan yang mempunyai aktivitas proteksi yang cukup tinggi terhadap sel (Bernard *et al.*, 1975). Perlakuan suhu rendah dengan media MS pada pratumbuh dan prakultur menginduksi

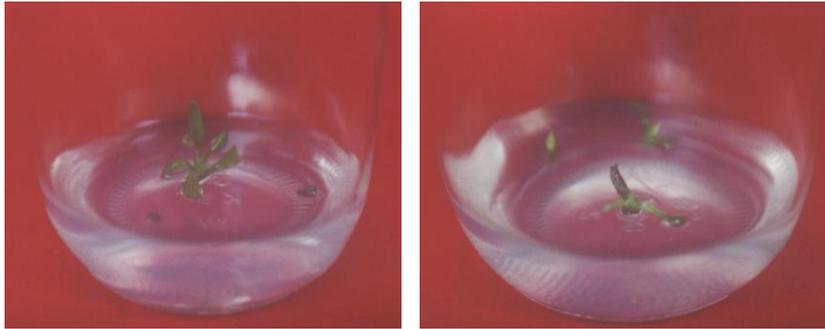
terjadinya kalus. Persentase kalus yang terbentuk berkisar antara 0-100% pada perlakuan dengan penambahan etilen glikol 1,5 dan 3%. Pada percobaan kriopreservasi, terbentuknya kalus tidak dikehendaki karena memungkinkan terjadinya variasi genetik. Menurut Grout (1995), sasaran keberhasilan kriopreservasi adalah untuk memelihara tingkat struktur dan fungsi yang terintegrasi dengan viabilitas yang tinggi serta aktivitas normal. Pada percobaan pra-kultur ini, respon terbaik dihasilkan dari kombinasi perlakuan pratumbuh pada suhu ruang dan prakultur pada suhu rendah dengan penggunaan media MSC ditambah etilen glikol 1,5 dan 3% pada taraf sukrosa 3 dan 6% serta penambahan DMSO 1,5% pada taraf sukrosa 8%, yaitu dengan tingkat survival sebesar 100% dan tingkat regenerasi 80% (Tabel 2). Kalus intermedier tampak tidak terbentuk pada perlakuan tersebut dan eksplan tidak mempunyai kelainan morfologi. Penampakan eksplan yang berhasil beregenerasi setelah diperlakukan dengan etilen glikol tampak lebih tegar dibandingkan dengan eksplan yang berhasil beregenerasi setelah diperlakukan dengan DMSO (Gambar 1).

Penggunaan krioprotektan sebelum pembekuan dimaksudkan untuk men-capai titik transisi sebelum terjadi nukleasi es. Pada kondisi seluler, titik tersebut tercapai pada suhu sekitar -100°C sedangkan kristal es terbentuk jauh sebelum su-hu tersebut tercapai (Blaksley *et al.*, 1996). Namun, waktu perendaman dan suhu ketika perendaman eksplan harus diperhatikan mengingat bahwa bahan yang ter-kandung dalam krioprotektan dapat bersifat racun. Menurut Towill dan Jarret (1992), krioprotektan berpotensi menyebabkan kerusakan yang diakibatkan dari efek fitotoksisitas komponen zat terlarut atau efek esmotik bahan terhadap viabi-litas sel.

Tabel 2. Daya recovery eksplan 4 minggu setelah kombinasi perlakuan pratumbuh dan prakultur

Pratumbuh	Taraf sukrosa (%)	Prakultur	Eksplan (%)				
			Hidup	Bertunas	Berakar	Membentuk kalus	
CH K, MSC	3	CH K, MS + E3	60	0	0	0	
		CH K, MS + E1,5	80	40	0	0	
		CH K, MS + D3	50	50	0	0	
	4	CH K, MS + D1,5	0	0	0	0	
		CH K, MS + E3	40	0	0	0	
		CH K, MS + E1,5	0	0	0	0	
	6	CH K, MS + D3	60	40	0	0	
		CH K, MS + D1,5	0	0	0	0	
		CH K, MS + E3	60	40	0	0	
	8	CH K, MS + E1,5	0	4	0	0	
		CH K, MS + D3	80	40	40	0	
		CH K, MS + D1,5	80	60	0	0	
		CH K, MS + E3	40	0	0	0	
	nCH, MS	3	CH K, MS + E1,5	25	25	0	0
			CH K, MS + D3	67	0	0	0
			CH K, MS + D1,5	67	0	40	0
CH K, MSC + E3			100	80	0	0	
4		CH K, MSC + E1,5	100	80	0	0	
		CH K, MSC + D3	80	60	0	0	
		CH K, MSC + D1,5	60	60	0	0	
		CH K, MSC + E3	20	20	0	0	
6		CH K, MSC + E1,5	80	80	0	0	
		CH K, MSC + D3	60	60	0	0	
		CH K, MSC + D1,5	20	20	0	0	
		CH K, MSC + E3	100	80	0	0	
8		CH K, MSC + E1,5	100	80	20	0	
		CH K, MSC + D3	60	60	0	0	
		CH K, MSC + D1,5	80	60	0	0	
		CH K, MSC + E3	80	60	0	0	
	CH K, MSC + E1,5	80	40	0	0		
	CH K, MSC + D3	60	60	0	0		
	CH K, MSC + D1,5	100	80	40	0		
	CH K, MSC + E3	80	60	0	0		

CH K = *cold-hardening* pada kulkas, nCH = *non cold-hardening* pada ruang kultur, MS = media MS, MSC = media MS termodifikasi, E1,5 = etilen glikol 1,5%, E3 = etilen glikol 3%, D1,5 = DMSO 1,5%, D3 = DMSO 3%



Gambar 1. Penampakan kultur ubi jalar pada umur 3 minggu setelah prakultur selama 2 hari dalam etilen glikol (kiri) dan DMSO (kanan)

Perendaman eksplan dalam larutan krioprotektan dilakukan secara gradual dari konsentrasi rendah ke konsentrasi yang lebih tinggi. Konsentrasi krioprotektan yang lebih rendah dari larutan vitrifikasi (PVS2) disebut sebagai *loading solution* (LS). 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 sito-sol. Efek proteksi dari larutan LS merupakan hasil akumulasi krioprotektan sitosolik selama prakultur dan efek proteksi terhadap plasmolisis (Takagi, 2000). Selain itu, keberadaan larutan LS di dalam ruang periprotoplasmik sel yang mengalami plasmolisis dapat menghindarkan terjadinya stress mekanik akibat dehidrasi.

Perendaman eksplan dalam larutan PVS2 dengan konsentrasi tinggi dilakukan pada suhu rendah untuk menghindari efek toksisitas PVS2. Setelah direndam dalam PVS2, daya survival dan regenerasi eksplan cenderung mengalami penurunan. Daya hidup dan regenerasi eksplan yang diperlakukan dengan sukrosa pada taraf 3% setelah perendaman dalam krioprotektan disajikan pada Tabel 3. Respon terbaik diperoleh dari kombinasi perlakuan pratumbuh dan prakultur pada suhu ruang dengan penggunaan etilen glikol 1,5% dan DMSO 3%. Penampakan eksplan yang tumbuh setelah direndam dalam PVS2 disajikan pada Gambar 2. Secara visual, terdapat perbedaan morfologi pada sebagian kecil kultur yang berhasil beregenerasi (Gambar 3). Hal ini dimungkinkan karena pengaruh penggunaan DMSO yang terdapat dalam larutan PVS2. DMSO dilaporkan dapat menjadi penyebab terjadinya kelainan fisiologi dan mutagenik (Takagi, 2000) atau keanekaragaman genetik dan epigenetik (Grout, 1995). Setelah pembekuan dalam nitrogen cair, eksplan tampak tetap hijau hingga 1 minggu kemudian warna hijau memudar dan akhirnya eksplan tidak dapat bertahan hidup. Kematian yang dialami eksplan karena kriopreservasi dapat disebabkan karena kerusakan mekanis, yaitu karena terbentuknya kristal es intraseluler.

Tabel 3. Daya *recovery* eksplan 6 minggu setelah perendaman dalam larutan krioprotektan

Pratumbuh	Prakultur	Hidup (%)	Tunas (%)	Akar (%)	Kalus (%)
nCH, MS	CH, MSC + E3	50	17	0	0
	CH, MSC + E1,5	43	0	0	0
	CH, MSC + D3	0	0	0	0
	CH, MSC + D1,5	0	0	0	0
nCH, MS	nCH, MS + E3	75	50	0	0
	nCH, MS + E1,5	100	60	0	0
	nCH, MS + D3	80	80	0	0
	nCH, MS + D1,5	40	40	0	0

CH K = *cold-hardening* pada kulkas, nCH = *non cold-hardening* pada ruang kultur, MS = media MS, MSC = media MS termodifikasi, E1,5 = etilen glikol 1,5%, E3 = etilen glikol 3%, D1,5 = DMSO 1,5%, D3 = DMSO 3%



Gambar 2. Penampakan kultur ubi jalar yang tumbuh pada media *recovery* setelah direndam dalam PVS2

Kriopreservasi Ubi Kayu

Perlakuan prakultur ubi kayu yang diterapkan pada percobaan ini merupakan modifikasi teknik yang pernah diterapkan oleh Charoensub *et al.* (2000), yaitu dengan menggunakan sukrosa 0,3 M. Untuk percobaan prakultur kriopreservasi ubi kayu hasilnya belum dapat ditampilkan karena masih dalam pengamatan. Penampakan visual kultur yang telah diperlakukan prakultur dapat dilihat pada Gambar 4.

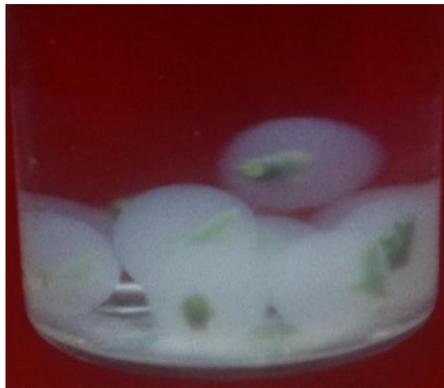
Penekanan Pelayuan dan Optimasi Regenerasi Ubi Kayu

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pelayuan tetap berlangsung pada semua media yang dicoba ditunjukkan dengan jumlah daun layu yang terbentuk sampai 16 minggu setelah tanam (Tabel 4).

Media dasar DKW lebih kaya dibandingkan dengan MS hal ini ditunjukkan dari total ion yang terkandung di dalamnya (Tabel 5). Media DKW dapat menekan pelayuan pada tanaman purwoceng karena konsentrasi



Gambar 3. Penampakan kultur ubi jalar yang berhasil beregenerasi dalam media regenerasi setelah perendaman dalam PVS2



Gambar 4. Penampakan visual kultur ubi kayu setelah prakultur pada media MS dengan sukrosa 0,3 M

Cl dan NH_4^+ -nya rendah tetapi konsentrasi Ca-nya tinggi (Mariska *et al.*, 1995). Kandungan Ca diperlukan eksplan untuk menyusun dinding sel sebagai perekat (Gardner *et al.*, 1991) sehingga akan menunjang ketegaran eksplan. Pada ubi kayu penekanan pelayuan pada medium DKW tidak berbeda dengan medium MS.

Dari Tabel 4 terlihat bahwa pemakaian media dasar yang berbeda (MS dan DKW) memberikan hasil yang tidak begitu berbeda pada penekanan pelayuan dan rata-rata pertumbuhan lain yang diamati.

Media terbaik untuk menekan pelayuan adalah MS yang ditambah dengan glutamin 100 mg/l, kinetin 0,1 mg/l, dan NAA 0,001 mg/l. Penambahan glutamin relatif lebih dapat menekan pelayuan dibandingkan dengan penambahan AgNO_3 atau kombinasi glutamin dan AgNO_3 . Glutamin banyak digunakan untuk menahan pelayuan (penguningan daun) seperti yang telah

Tabel 4. Rata-rata pertumbuhan tunas satu buku ubi kayu pada media penekanan pelayuan 16 minggu setelah tanam

Media	Jumlah tunas	Jumlah buku	Jumlah daun	Jumlah daun layu	Tinggi tanaman	Perakaran (%)	Kalus (%)
D + GI + BA + N	2,00	5,10	4,30	1,40	9,83	100,00	60,00
D + GI + Ag + BA + N	1,40	3,57	4,00	1,00	0,86	80,00	80,00
D + Ag + BA + N	1,50	4,89	5,44	1,33	4,43	66,67	16,67
D + GI + K + N	2,00	5,50	3,50	2,50	14,59	83,33	0,00
D + GI + Ag + K + N	1,67	4,40	4,30	1,20	2,38	83,33	33,33
D + Ag + K + N	1,20	7,00	6,50	1,83	11,20	80,00	0,00
M + GI + BA + N	2,50	4,27	3,73	1,13	5,35	66,67	0,00
M + GI + Ag + BA + N	1,20	4,17	3,17	2,17	1,18	80,00	0,00
M + Ag + BA + N	2,60	4,31	3,08	2,00	5,72	60,00	0,00
M + GI + K + N	1,40	5,43	5,43	0,86	5,06	80,00	0,00
M + GI + Ag + K + N	1,50	3,67	3,22	1,33	1,21	66,67	0,00
M + Ag + K + N	2,17	4,15	3,31	1,69	2,09	66,67	0,00

D = medium dasar DKW, M = medium dasar MS, GI = glutamin 100 mg/l, Ag = AgNO₃ 1 mg/l, BA = BAP 0,1 mg/l, K = kinetin 1 mg/l, N = NAA 0,001 mg/l

Tabel 5. Perbandingan unsur hara makro pada medium dasar MS dan DKW

Unsur hara makro	MS		DKW	
	mg/l	mM	mg/l	mM
N	840,9	9,8	728,5	7,2
P	38,8	0,3	58,9	0,4
K	783,6	7,7	774,1	4,5
Ca	119,7	0,8	372,2	1,7
Mg	36,1	0,2	72,2	0,3
S	48,1	0,2	383,1	0,4
Cl	212,5	1,4	71,0	0,4
Total ion	2079,7	20,41	2460,0	14,9

diaplikasikan pada melinjo (Yelnititis *et al.*, 1995). Pada tanaman pulau kombinasi glutamin dan AgNO₃ pada media dapat menahan penguningan (pelayuan) daun (Purnamaningsih *et al.*, 1998). Penggunaan AgNO₃ dikurangi karena senyawa ini merupakan logam berat yang dikhawatirkan residu logam beratnya terbawa hingga tanaman diaklimatisasi meskipun belum ada laporan yang menyatakan bahwa penggunaan senyawa ini akan meninggalkan residu pada tanaman yang diperbanyak secara *in vitro*.

Penambahan BA pada medium MS, dapat meningkatkan pengandaan tunas adventif ubi kayu dengan rata-rata tunas yang tumbuh sebanyak 2,60 dan 2,50. Untuk penambahan buku lebih baik pada media DKW dengan penambahan kinetin. Selain menginduksi penambahan buku, penambahan kinetin juga lebih meningkatkan tinggi tanaman sehingga jarak ruasnya lebih panjang tetapi batangnya lebih kecil, tidak tegar, dan warnanya lebih muda (etiolasi). Hal ini jelas terlihat pada tunas yang ditumbuhkan pada medium DKW dengan penambahan kinetin, NAA, dan glutamin di mana rata-rata

tinggi tanaman mencapai 14,59 cm sementara rata-rata jumlah buku hanya 5,50 atau rata-rata jarak ruasnya 2,65 cm.

Pada semua media yang dicoba, akar diinduksi pada semua perlakuan. Pada media dasar DKW akar yang terbentuk lebih pendek dan ada yang terbentuk pada kalus yang tumbuh pada pangkal tunas. Akar yang tumbuh pada media MS tumbuh pada pangkal batang dan memiliki bulu-bulu akar sehingga membentuk planlet yang sempurna.

Untuk mendapatkan media regenerasi yang optimal dengan tingkat pelayuan yang rendah, pertunasan dicoba kembali pada media DKW dengan penambahan glutamin dan BA dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Hasil pengamatan menunjukkan, peningkatan pembentukan tunas adventif pada semua konsentrasi BA yang dicoba dengan tinggi tanaman yang lebih rendah serta tingkat pelayuan yang relatif kecil (Tabel 6). Tingkat pelayuan daun yang relatif rendah pada BA 1 mg/l, yaitu 0,30 dibandingkan dengan BA dengan konsentrasi yang lebih tinggi (3, 5, dan 10 mg/l) karena menurut Yu dan Yang (1979) dan Mook *et al.* (1987) sitokinin dapat merangsang biosintesis etilen. Dengan adanya akumulasi etilen dalam botol dapat menurunkan laju respirasi dan aktivitas metabolik lainnya sehingga biakan dapat cepat menjadi layu.

Penambahan BA sampai 100 kali dari penelitian sebelumnya menunjukkan peningkatan rata-rata pertumbuhan tunas adventif hampir 1,5 kalinya. Penambahan BA 3 mg/l dan 10 mg/l menunjukkan rata-rata pertunasan yang sama (3,00), tetapi pada media dengan BA 10 mg/l pertumbuhan bukunya lebih baik (3,33). Pertumbuhan buku terbanyak terdapat pada media dengan penambahan BA 5 mg/l dengan rata-rata pertumbuhan buku sebanyak 4,57. Penampakan kultur pada media dengan penambahan BA yang tinggi memperlihatkan jumlah tunas lebih banyak tetapi menyebabkan terbentuk kalus yang kompak (Gambar 5).

Pada media yang dicoba, pelayuan yang terjadi tertinggi pada media dengan penambahan BA 5 mg/l dengan rata-rata pelayuan hanya 1,60 bahkan pada media dengan penambahan BA 1 mg/l rata-rata pelayuannya hanya 0,30

Tabel 6. Rata-rata pertumbuhan tunas satu buku ubi kayu pada media optimasi 16 minggu setelah tanam

Media (mg/l)	Jumlah tunas	Jumlah buku	Jumlah daun	Jumlah daun layu	Tinggi tanaman	Perakaran (%)	Kalus (%)
D + Gl + N + BA 1	2,50	3,40	4,80	0,30	0,55	30,00	100,00
D + Gl + N + BA 3	3,00	2,78	2,56	1,00	0,44	0,00	100,00
D + Gl + N + BA 5	2,80	4,57	4,64	1,60	2,85	80,00	100,00
D + Gl + N + BA 10	3,00	3,33	4,00	0,83	1,30	90,00	100,00

D = medium dasar DKW, Gl = glutamin 100 mg/l, BA = BAP 0,1 mg/l, N = NAA 0,001 mg/l



Gambar 5. Penampakan kultur ubi kayu dalam media dengan penambahan BA pada konsentrasi tinggi

setelah 16 minggu dikulturkan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi BA pada medium DKW tidak dapat menekan pelayuan, tetapi dapat meningkatkan jumlah buku. Secara visual terlihat bahwa dengan penambahan konsentrasi BA, batang *in vitro* ubi kayu lebih tegar, lebih hijau, dan relatif lebih besar lingkar batangnya.

KESIMPULAN

Perlakuan pratumbuh yang optimum ialah menggunakan media MS pada suhu ruang, sedangkan perlakuan prakultur yang optimum ialah kombinasi perlakuan pratumbuh yang terbaik dengan media MS yang termodifikasi dengan penambahan etilen glikol pada suhu ruang. Perendaman eksplan pada krioprotektan secara gradual memberikan hasil yang baik. Prosedur yang telah dilakukan harus dikembangkan lebih lanjut untuk memperoleh metode *thawing* dan media *recovery* yang optimal.

Penggunaan media dasar MS dan DKW tidak memberikan perbedaan pada rata-rata pertumbuhan dan pelayuan tunas ubi kayu. Media optimasi terbaik untuk pertumbuhan tunas ubi kayu adalah media DKW dengan penambahan BA 3-10 mg/l, glutamin 100 mg/l, dan NAA 0,001 mg/l.

DAFTAR PUSTAKA

Bernard, J., F.M.E. Zavala, and J.M. Ulrich. 1975. Cryoprotective compounds in the viable freezing of plant tissues. *In* Kartha, K.K. (Ed). Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press Inc. Florida. p. 76-107.

- Blaksley, 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. 2000.** Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of cassava cooled to -196°C by vitrification. *In* Engelmann, F. and H. Takagi (*Eds.*). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. IPGRI. Rome-Italy.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce, dan R.L. Mitchell. 1991.** Fisiologi tanaman budidaya (Terjemahan Herawati Susilo). Jakarta. UI Press. 428 hlm.
- Grout, B.W.W. 1995.** Introduction to the *in vitro* preservation of plant cells, tissues and organs. *In* Grout, B. (*Ed.*). *Genetic Preservation of Plant Cells In Vitro*. Springer Lab Manual. Berlin-Heidelberg. p. 1-17.
- Hanarida, I., 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 sumber daya genetik tanaman pangan. Makalah dalam Seminar Tahunan Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman II. Bogor, 30-31 Januari.
- Hirai, D., K. Shirai, S. Shirai, and A. Sakai. 1998.** Cryopreservation of *in vitro*-grown meristems of strawberry (*fragaria X ananssa* Duch.) by encapsulation vitrification. *Euphytica* 101:109-115.
- Mariska, I., R. Purnamaningsih, dan M. Kosmiatin. 1995.** Pertumbuhan biakan purwoceng pada beberapa media dasar. Prosiding Kongres Ilmu Pengetahuan Nasional VI. Jakarta, 11-15 Desember. hlm. 250-256.
- 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.
- Mook, M.C., D.W.S. Mok, J.E. Turner, and C.V. Mujev. 1987.** Biological and biochemical effect of cytokinin active phenilurea derivatives in tissue culture system. *Hort Sci.* 22(6):1194-1197.
- Purnamaningsih, R., I. Mariska., E.G. Lestari, dan S. Rahayu. 1998.** Proliferasi tunas dan penekanan penguningan daun sebagai usaha pelestarian tumbuhan pulau. *Jurnal Plasma Nutfah* III(1):1-7.

- Sakai, A. 1993.** Cryogenic strategies for survival of plant cultured cells and meristem colled to -196°C. *In* Sakai, A. (Ed). Cryopreservation of Plant Genetic Resources. JICA. Japan. p. 1-25.
- 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.
- Sunarlim, N., Minantyorini, N. Zuraida, dan I.S. Dewi. 1999.** Pelestarian plasma nutfah ubi-ubian secara kultur *in vitro*. Laporan Hasil Penelitian TA 1998/1999. 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.
- Yelnititis, I. Mariska, dan E.G. Lestari. 1995.** Penekanan permasalahan penguningan dan gugurnya organ pada pertunasan *in vitro* tanaman Melinjo. Prosiding Evaluasi Hasil Penelitian Tanaman Industri. Puslitbang Tanaman Industri. Bogor. hlm. 56-61.
- Yu, Y.B. and S.F. Yang. 1979.** Auxin induced ethylene production and its inhibition by amino ethoxyvinil glycine and cobalt ion. *Plant Physiol.* 64(6):1074-1077.