

PENYIMPANAN *IN VITRO* TANAMAN PURWOCENG (*Pimpinella pruatjan* Molk.) MELALUI APLIKASI PENGECERAN MEDIA DAN PACLOBUTRAZOL

I. ROOSTIKA¹, R. PURNAMANINGSIH¹, dan I. DARWATI²

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jl. Tentara Pelajar 3A Bogor-16111

² Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik
Jl. Tentara Pelajar 3 Bogor 16111

(Terima tgl. 16/1/2008 – Terbit tgl. 8/4/2009)

ABSTRAK

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) adalah tanaman obat langka asli Indonesia yang dikategorikan hampir punah. Konservasi *in situ* tidak dapat diandalkan karena rusaknya habitat alami (hutan konservasi), sedangkan konservasi *ex situ* di lapang menghadapi kendala karena purwoceng sulit dibudidayakan di luar habitat aslinya. Dengan demikian, konservasi *in vitro* merupakan alternatif yang dapat diterapkan untuk menghindari kepunahan tanaman purwoceng. Tujuan penelitian untuk mengetahui efek dari kombinasi perlakuan pengenceran media dan konsentrasi paclobutrazol terhadap pertumbuhan kultur purwoceng, daya regenerasi dan stabilitas genetik pasca penyimpanan. Penelitian dilakukan pada tahun 2004 di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor selama 9 bulan. Bahan tanaman yang digunakan bersumber dari koleksi tanaman purwoceng di Kebun Percobaan Gunung Putri, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Kegiatan penelitian mencakup: (1) Perbanyakan tunas *in vitro* purwoceng sebagai sumber eksplan dengan menggunakan regenerasi, yaitu media DKW + BA 1 ppm + Thidiazuron 0,2 ppm + arginin 100 ppm, (2) Penyimpanan *in vitro* tunas purwoceng dalam media DKW (1, ½, dan ¼ dosis) + paclobutrazol (0, 1, 3, dan 5 ppm), (3) Regenerasi kultur purwoceng pasca penyimpanan *in vitro* pada media regenerasi, dan (4) Evaluasi karakter sitologi kultur yang telah disimpan melalui penghitungan jumlah kloroplas sel penjaga stomata. Rancangan percobaan disusun secara faktorial dalam lingkungan acak lengkap dengan 6 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya interaksi yang nyata antara pengenceran media dan konsentrasi paclobutrazol. Periode simpan kultur tidak dapat diperpanjang lebih dari 4 bulan karena paclobutrazol mempunyai pengaruh penghambatan pertumbuhan yang sangat kuat sehingga sebagian besar kultur purwoceng mati. Efek residu paclobutrazol masih tampak pada jangka waktu lebih dari 4 bulan pada tahap pemulihan, ditandai dengan adanya penampilan roset. Pengamatan ciri sitologi melalui penghitungan jumlah kloroplas sel penjaga stomata menunjukkan bahwa penggunaan paclobutrazol tidak menyebabkan perubahan tingkat ploidi. Disimpulkan bahwa paclobutrazol tidak sesuai digunakan untuk penyimpanan *in vitro* purwoceng karena menyebabkan pertumbuhan yang abnormal (roset) sekalipun pada tahap regenerasi pasca penyimpanan. Selanjutnya disarankan untuk menggunakan regulator osmotik, yang mampu meningkatkan potensi osmotik dalam media dan memperlambat penyerapan nutrisi sehingga masa simpan kemungkinan dapat diperpanjang tanpa menyebabkan pertumbuhan yang abnormal pada tahap regenerasi pasca penyimpanan.

Kata kunci : *Pimpinella pruatjan* Molk., penyimpanan *in vitro*, pengenceran media, dan paclobutrazol

ABSTRACT

In vitro preservation of *Pruatjan* (*Pimpinella pruatjan* Molk.) using dilution and paclobutrazol

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) is an Indonesian medicinal plant categorized as endangered plant. *In situ* conservation is quite impossible since conservation forest has been damaged whereas *ex situ* conservation in the field is difficult because the plant needs specific agronomical condition. *In vitro* conservation is therefore the only choice to be applied. The objectives of the study were to find out the effects of combined treatment between media dilution and paclobutrazol concentration to the growth of pruatjan cultures, the genetic regeneration and stability after preservation. The research was conducted at the Tissue Culture Laboratory, the Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development for 9 months. The plant materials were taken from Gunung Putri. The activities included: (1) Propagation of *in vitro* shoots as explants source in DKW media + 1 ppm BA + 0.2 ppm Thidiazuron + 100 ppm arginin, (2) Preservation of *in vitro* shoots of pruatjan on DKW (full, half, and quarter strength) + paclobutrazol (0, 1, 3, and 5 ppm), (3) Regeneration of the cultures after *in vitro* preservation, and (4) Evaluation of cytological character of preserved cultures through chloroplast guard cells counting. The experiment was arranged factorially in Completely Randomized Design with 6 replications. The result revealed that there was no interaction between media dilution and paclobutrazol concentration. Preservation period could not be prolonged more than 4 months because this compound strongly inhibited the growth so that almost none of them could survive longer. The residual effect of paclobutrazol was still appeared more than 4 months in regeneration phase assigned by rosette performances. Observation of cytological character through chloroplast guard cells counting revealed that paclobutrazol could not change ploidy level of preserved pruatjan cultures. It was concluded that paclobutrazol is not suitable for *in vitro* preservation of pruatjan since it causes abnormal growth on regeneration step after preservation. Thus, it was suggested to use osmotic regulator which can increase osmoticum potential in media and decrease nutrition absorption so that preservation period may be prolonged without abnormal effect on regeneration step after preservation.

Key words: *Pimpinella pruatjan* Molk., *in vitro* preservation, media dilution, and paclobutrazol

PENDAHULUAN

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) adalah tanaman obat langka asli Indonesia yang dikategorikan *endangered* atau hampir punah. Tanaman tersebut bernilai ekonomis tinggi karena berkhasiat obat, seperti sebagai afrodisiak, diuretik, dan tonik. Dilaporkan bahwa saat ini tanaman tersebut hanya tersisa di areal petani yang sangat sempit yaitu di Desa Sekunang, Dataran Tinggi Dieng (RAHARDJO, 2003; SYAHID *et al.*, 2004). Habitat asli tanaman purwoceng sudah punah dengan rusaknya hutan konservasi akibat kegiatan eksploitasi yang berlebihan sehingga konservasi *in situ* (pada habitatnya) tidak dapat diandalkan. Konservasi *ex situ* (di luar habitatnya) akan lebih sesuai untuk diterapkan. Tanaman purwoceng sulit dibudidayakan di luar habitatnya dan memerlukan persyaratan agronomis yang spesifik sehingga konservasi *ex situ* di lapang juga menghadapi permasalahan. Selain itu, konservasi di lapang dilaporkan akan menghadapi resiko hilangnya populasi tanaman tersebut karena cekaman biotik (organisme pengganggu tanaman) dan abiotik seperti kekeringan, banjir, atau kebakaran. Pemeliharaan tanaman di lapang juga akan membutuhkan area, tenaga, waktu, dan biaya yang besar (MARISKA *et al.*, 1996).

Teknik konservasi *in vitro* merupakan teknologi alternatif yang dapat diterapkan untuk menghindari kepunahan tanaman purwoceng. Menurut LEUNUFNA (2004), konservasi *in vitro* sebagai koleksi aktif dapat diterapkan dengan menggunakan teknik pertumbuhan minimal untuk penyimpanan jangka menengah. Koleksi aktif tersebut dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan ketika dibutuhkan, seperti perbanyakan tanaman secara masal atau untuk produksi metabolit sekunder secara *in vitro*. Beberapa hal yang dapat dilakukan dalam teknik konservasi *in vitro* secara pertumbuhan minimal, antara lain: (1) penurunan temperatur lingkungan dan intensitas cahaya (CHA-UM *et al.*, 2007), (2) penggunaan regulator osmotik seperti sukrosa dan manitol (SUNARLIM dan ZURAIDA, 2001), (3) penurunan taraf beberapa faktor esensial seperti pengenceran media (SESWITA *et al.*, 2003), (4) penggunaan retardan seperti paclobutrazol, cycocel, dan ancymidol (ROOSTIKA dan SUNARLIM, 2001), dan (5) penggunaan zat penghambat tumbuh (LESTARI dan PURNAMANINGSIH, 2005). Beberapa jenis tanaman yang telah berhasil disimpan dengan teknik pertumbuhan minimal adalah ubi kayu (SUNARLIM dan ZURAIDA, 2001), ubi jalar (ROOSTIKA dan SUNARLIM, 2001), gembili (SUNARLIM *et al.*, 2004), kentang hitam (ROOSTIKA *et al.*, 2005), uwi (SUNARLIM dan ROOSTIKA, 2003), talas (DEWI, 2002), pisang (CHA-UM *et al.*, 2007), kentang (SARKAR *et al.*, 1999), panili (SESWITA *et al.*, 2003), sambang colok (AMALIA *et al.*, 2004), bangle (IBRAHIM, 2005), dan temulawak (SYAHID, 2007).

Selain dengan melakukan optimasi teknik konservasi, suatu prosedur konservasi *in vitro* yang efektif dapat

diperoleh melalui pengujian stabilitas sifat bahan tanaman pasca penyimpanan. Evaluasi protokol konservasi dapat dilakukan melalui pengamatan stabilitas sifat seperti pengamatan ciri anatomi dan sitologi. Analisis tingkat ploidi dapat dilakukan melalui penghitungan jumlah kromosom (DOLEZEL *et al.*, 1998) dan jumlah kloroplas sel penjaga stomata (QIN dan ROTINO, 1995). Sedangkan analisis *flowcytometry* cukup rumit dan mahal serta harus dilakukan oleh tenaga ahli (DOLEZEL *et al.*, 1998; LYSAK *et al.*, 1999; JONES *et al.*, 2007). Oleh karena itu, penghitungan jumlah kloroplas sel penjaga stomata menjadi alternatif analisis yang aplikatif, karena mudah dilakukan dan murah biayanya.

Konservasi *in vitro* kultur purwoceng telah dilakukan oleh RAHAYU dan SUNARLIM (2002) dengan menggunakan retardan pada taraf 0 – 5 ppm. Hingga masa penyimpanan 2,5 bulan, penggunaan paclobutrazol dilaporkan lebih baik daripada ancymidol, namun daya regenerasi kultur pasca penyimpanan dan pengujian stabilitas sifat bahan tanaman setelah penyimpanan belum dikaji. Pengenceran media penyimpanan diduga dapat memperpanjang masa simpan kultur karena kandungan hara semakin terbatas, sebagaimana dilaporkan oleh ROOSTIKA dan SUNARLIM (2001) pada penyimpanan ubi jalar. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek dari kombinasi perlakuan pengenceran media dan konsentrasi paclobutrazol terhadap pertumbuhan kultur purwoceng, daya regenerasi dan stabilitas genetik pasca penyimpanan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada tahun 2004 di Laboratorium Kultur Jaringan kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor selama 9 bulan. Bahan tanaman yang digunakan bersumber dari koleksi tanaman purwoceng di Kebun Percobaan Gunung Putri, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro). Bahan tanaman tersebut sudah ditumbuhkan secara *in vitro* melalui proses germinasi dan proliferasi tunas dengan total periode *in vitro* sekitar 3 tahun.

Kegiatan penelitian mencakup: (1) Perbanyakan tunas *in vitro* purwoceng sebagai sumber eksplan, (2) Penyimpanan *in vitro* tunas purwoceng, (3) Regenerasi kultur purwoceng pasca penyimpanan *in vitro*, dan (4) Evaluasi karakter sitologi kultur pasca penyimpanan. Kondisi inkubasi untuk perbanyakan dan penyimpanan *in vitro* adalah di ruang kultur dengan suhu $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, intensitas penyorotan 800 – 1000 lux dengan fotoperiodisitas 16 jam terang.

Perbanyak Tunas *in vitro* Purwoceng sebagai Sumber Eksplan

Peranyakan sumber eksplan dilakukan dengan menanam tunas *in vitro* purwoceng pada media regenerasi, yaitu media DKW (DRIVER dan KUNYAKI, 1984) dengan penambahan BA 1 ppm dan thidiazuron 0,2 ppm serta arginin 100 ppm. Tindakan subkultur dilakukan secara rutin, maksimal setiap dua bulan hingga diperoleh sejumlah tunas yang memadai untuk percobaan penyimpanan *in vitro*.

Penyimpanan *in vitro* Tunas Purwoceng

Eksplan yang digunakan pada percobaan penyimpanan *in vitro* adalah tunas tanpa daun. Media penyimpanan yang dicobakan adalah media dasar DKW pada taraf penuh (D), setengah dosis ($\frac{1}{2}D$), dan seperempat dosis ($\frac{1}{4}D$) dengan penambahan BA 1 ppm serta paclobutrazol pada taraf 0, 1, 3, dan 5 ppm. Rancangan percobaan disusun secara faktorial dalam lingkungan acak lengkap dengan 6 ulangan, masing-masing satu tunas setiap botol kultur. Peubah yang diamati adalah jumlah total daun, jumlah daun segar, jumlah daun layu, dan penampilan visual kultur. Rasio daun segar diperoleh dengan membagi jumlah daun segar dengan jumlah total daun, dikalikan seratus persen. Data yang diperoleh dengan analisis tren.

Regenerasi Kultur Purwoceng Pasca Penyimpanan *in vitro*

Setelah periode simpan 4 bulan, seluruh kultur dari masing-masing perlakuan yang masih hidup, dipindahkan ke media regenerasi untuk dipulihkan kembali. Pada tahap ini, peubah yang diamati adalah persentase kultur yang hidup dan tumbuh normal (ruas tidak roset).

Evaluasi Karakter Sitologi Kultur Pasca Penyimpanan

Evaluasi karakter sitologi berupa penghitungan jumlah kloroplas sel penjaga stomata, dilakukan terhadap kultur yang telah disimpan dan diregenerasikan selama 4 bulan. Dari masing-masing perlakuan, diambil satu sampel daun. Daun yang digunakan adalah daun yang telah berkembang hingga ukuran normal supaya daun mudah disayat dan kerapatan selnya tidak terlalu tinggi, sehingga kloroplas sel penjaga stomata mudah untuk dihitung. Dibuat sayatan tipis dari bagian epidermis lapisan bawah daun. Sayatan tipis tersebut diletakkan di atas gelas obyek, ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah

mikroskop pada perbesaran 400 kali. Jumlah kloroplas dari 3 – 7 sel penjaga stomata dihitung. Pengambilan gambar/foto dilakukan secara langsung dengan menghubungkan mikroskop dan kamera ke komputer. Perbesaran kamera adalah 2 kali dari perbesaran oleh mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peranyakan Tunas *in vitro* Purwoceng Sebagai Sumber Eksplan

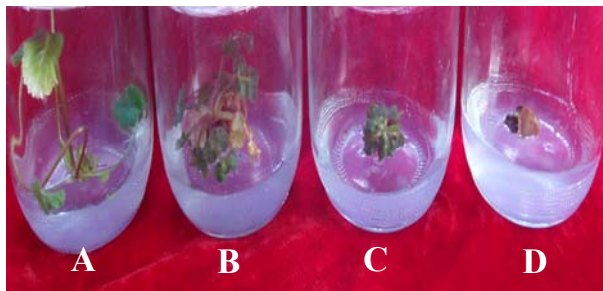
Eksplan purwoceng mempunyai tingkat proliferasi yang tinggi pada media regenerasi yang digunakan. Dari media tersebut, tumbuh sekitar 5 tunas dengan penampilan yang segar dan tingkat kelayuan daun yang rendah. Kondisi kultur yang demikian ideal digunakan sebagai sumber eksplan karena tunas-tunas yang muncul bersifat seragam.

Penyimpanan *in vitro* Tunas Purwoceng

Penggunaan paclobutrazol hingga taraf 5 ppm telah banyak diaplikasikan pada beberapa tanaman untuk upaya konservasi *in vitro*, seperti pada tanaman pulai, pulasari, daun dewa (LESTARI dan MARISKA, 1997), ubi jalar (ROOSTIKA dan SUNARLIM, 2001), dan kentang hitam (ROOSTIKA *et al.*, 2005). Penggunaan paclobutrazol pada taraf yang lebih tinggi akan menyebabkan keracunan pada jaringan dan kematian tanaman.

Hasil penelitian penyimpanan *in vitro* menunjukkan bahwa pada awalnya, secara visual tingkat pertumbuhan kultur purwoceng berbeda-beda. Semakin tinggi taraf paclobutrazol maka semakin besar pula tingkat penghambatan pertumbuhan kultur purwoceng umur 1 bulan pada periode simpan (Gambar 1). Ketika periode simpan 4 bulan, tidak terdapat interaksi yang nyata antara faktor pengenceran media dengan taraf paclobutrazol. Secara tunggal, pengenceran media memberikan pengaruh yang tidak nyata sedangkan paclobutrazol memberikan pengaruh yang nyata untuk peubah jumlah total daun dengan tren kuadratik (Gambar 2) dan rasio daun segar dengan tren linier (Gambar 3), namun tidak demikian untuk peubah jumlah tunas.

Penggunaan paclobutrazol menyebabkan kultur menjadi roset, yaitu dengan ruas-ruas yang pendek. Semakin tinggi taraf paclobutrazol maka penampilan roset tersebut semakin nyata dimana ruas-ruas daun yang terbentuk semakin pendek. Tingkat roset yang tinggi tersebut tentu saja bersifat negatif terhadap pertumbuhan kultur karena luas area daun yang berfotosintesis menjadi berkurang disebabkan oleh adanya daun-daun yang tumpang tindih sehingga banyak daun yang tertutupi oleh



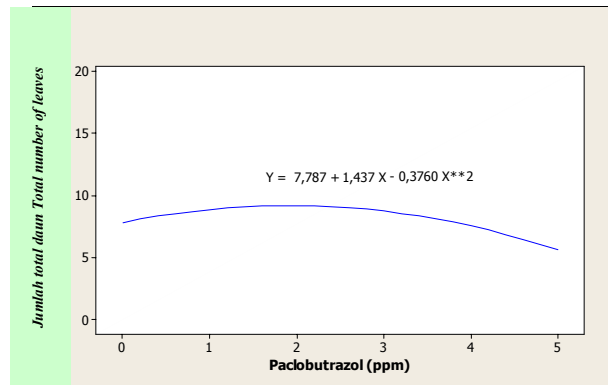
Gambar 1. Penampilan visual kultur purwoceng (umur 1 bulan) yang disimpan dalam media dengan penambahan paclobutrazol: 0 ppm (A), 1 ppm (B), 3 ppm (C), dan 5 ppm (D)
 Figure 1. Visual performance of pruatjan cultures (1 month of age) preserved on media with addition of paclobutrazol of 0 ppm (A), 1 ppm (B), 3 ppm (C), and 5 ppm (D)

daun yang berada di atasnya. Fenomena demikian juga terjadi pada penyimpanan *in vitro* ubi jalar dengan menggunakan paclobutrazol (ROOSTIKA dan SUNARLIM, 2001), dimana perlakuan paclobutrazol taraf tinggi menyebabkan kematian kultur yang lebih dini.

Untuk peubah rasio daun segar, semakin tinggi taraf paclobutrazol maka semakin rendah pula rasio daun segar. Untuk peubah jumlah total daun, taraf paclobutrazol yang optimum adalah sekitar 2 ppm. Dari hasil tersebut tampak bahwa penambahan paclobutrazol tidak hanya dapat menghambat pertumbuhan kultur purwoceng melainkan juga dapat memacu pertumbuhannya dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Secara visual, kultur dari perlakuan paclobutrazol mempunyai warna hijau daun yang lebih tua. Diduga penambahan paclobutrazol pada media dapat meningkatkan kandungan klorofil pada daun sehingga proses fotosintesis berjalan lebih baik. Sebagaimana dilaporkan oleh CATHEY (1975), retardan dapat meningkatkan kandungan klorofil.

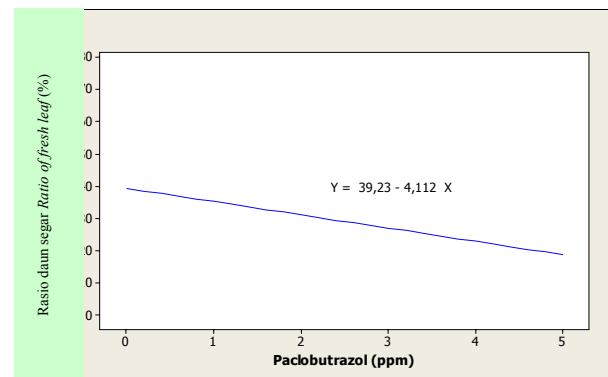
Berdasarkan hasil tersebut dapat diduga bahwa penurunan kandungan hara melalui pengenceran media tampaknya tidak efektif memperpanjang masa simpan kultur purwoceng dibandingkan dengan formula penuhnya. Namun demikian, hasil tersebut juga memberikan indikasi bahwa kandungan hara yang lebih rendah dari formula penuhnya terbukti sudah cukup menopang pertumbuhan kultur purwoceng dalam upaya konservasi *in vitro*. Dalam hal ini, penggunaan media yang diencerkan akan lebih menghemat biaya sehingga lebih efisien.

Periode penyimpanan adalah faktor yang paling penting dalam konservasi terutama dalam teknik pertumbuhan minimal. Konservasi yang efektif adalah yang mempunyai jangka waktu relatif lama tanpa tindakan subkultur. Pada konservasi purwoceng ini, periode simpan yang maksimal adalah selama 4 bulan. Setelah periode simpan tersebut, banyak kultur yang mati sehingga periode simpan tidak dapat diperpanjang. Kematian kultur diduga



Gambar 2. Pengaruh paclobutrazol terhadap jumlah total daun kultur purwoceng, 4 bulan pada periode simpan

Figure 2. Effect of paclobutrazol on the total number of leaves of pruatjan cultures, 4 months period of preservation



Gambar 3. Pengaruh paclobutrazol terhadap rasio daun segar kultur purwoceng, 4 bulan pada periode simpan

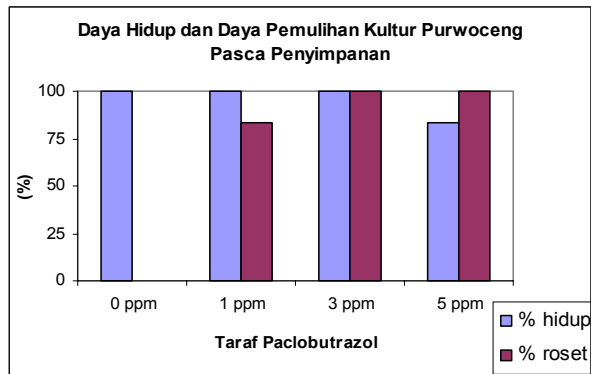
Figure 3. Effect of paclobutrazol on the ratio of fresh leaf of pruatjan cultures, 4 months period of preservation

karena pengaruh paclobutrazol yang sangat kuat dalam menghambat pertumbuhannya. Penghambatan yang sangat kuat akan berpengaruh negatif bagi kelangsungan hidup kultur. Selain itu, penampilan kultur yang roset (karena pengaruh paclobutrazol) diduga menyebabkan energi yang dibutuhkan untuk proses respirasi lebih besar daripada energi yang dihasilkan dari proses fotosintesis.

Regenerasi Kultur Purwoceng Pasca Penyimpanan *in vitro*

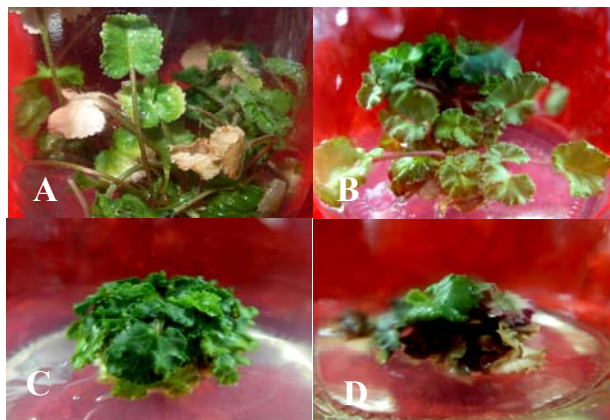
Pada tahap regenerasi pasca penyimpanan, hasil menunjukkan bahwa kultur dari perlakuan paclobutrazol 0, 1, dan 3 ppm semuanya dapat tumbuh, sedangkan yang berasal dari perlakuan paclobutrazol 5 ppm hanya 83,5% yang tumbuh. Hal ini menunjukkan bahwa efek residu paclobutrazol masih cukup tinggi, sehingga pada umur

4 bulan periode pemulihanpun, persentase kultur yang tumbuh abnormal (roset) masih tinggi (Gambar 4 dan 5). Dengan demikian, paclobutrazol tidak sesuai digunakan untuk penyimpanan *in vitro* purwoceng karena menyebabkan pertumbuhan yang abnormal (roset) sekalipun pada tahap regenerasi pasca penyimpanan. Hal sebaliknya terjadi pada penyimpanan kultur kentang hitam, dimana paclobutrazol lebih baik daripada ancymidol dan manitol (ROOSTIKA *et al.*, 2005). Menurut MARISKA *et al.* (1996), respon tiap-tiap jenis tanaman terhadap zat pengatur dan penghambat tumbuh dapat berbeda-beda, bahkan sampai ke tingkat varietas.



Gambar 4. Pengaruh perlakuan paclobutrazol terhadap daya pemulihan dan regenerasi kultur purwoceng pasca penyimpanan, 4 bulan setelah subkultur dalam media regenerasi

Figure 4. Effect of paclobutrazol treatment on the recovery and regeneration of pruatjan cultures after preservation, 4 months after sub culture in regeneration media



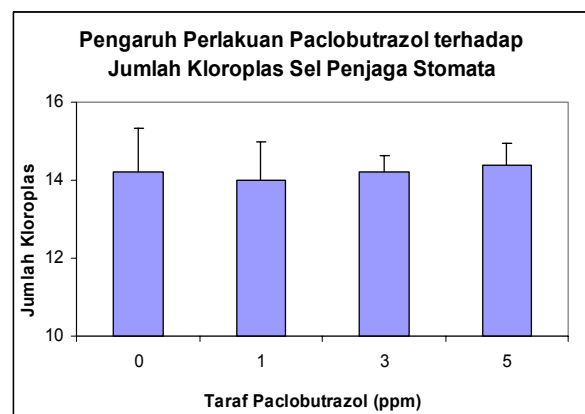
Gambar 5. Penampilan visual kultur purwoceng (yang berasal dari beberapa perlakuan paclobutrazol) pada tahap regenerasi, 4 bulan setelah subkultur: kontrol (A), paclobutrazol 1 ppm (B), paclobutrazol 3 ppm (C), dan paclobutrazol 5 ppm (D)

Figure 5. Visual performance of pruatjan cultures (derived from some paclobutrazol treatment) the regeneration phase, 4 months after sub culture : paclobutrazol of 0 ppm (A), 1 ppm (B), 3 ppm (C), and 5 ppm (D)

Evaluasi Karakter Sitologi Kultur Pasca Penyimpanan

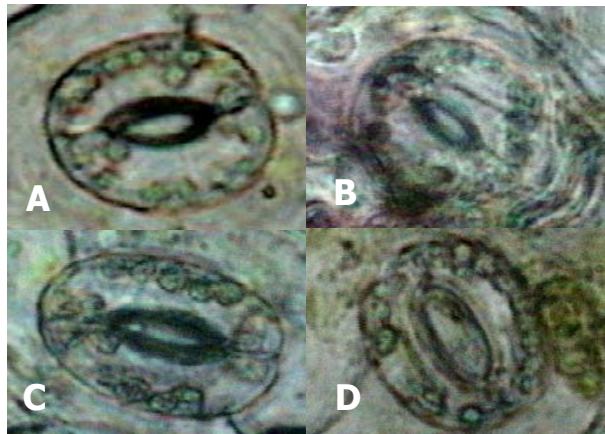
Pada penelitian ini digunakan penghitungan jumlah kloroplas dari sel penjaganya. Selain lebih sederhana dari sisi teknis, jumlah kloroplas sel penjaga dilaporkan lebih stabil dalam menggambarkan latar belakang genetik (QIN dan ROTINO, 1995). Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan paclobutrazol pada semua taraf (0, 1, 3, dan 5 ppm) tidak menyebabkan perbedaan dalam jumlah kloroplas dalam sel penjaganya. Jumlah kloroplas adalah sekitar 14 kloroplas per sel (Gambar 6 dan 7). Dengan demikian, penggunaan paclobutrazol tidak mempengaruhi tingkat ploidi bahan tanaman purwoceng pada saat sebelum dan setelah penyimpanan. Hal ini berarti paclobutrazol tidak mempengaruhi stabilitas genetik kultur purwoceng. Menurut SARIA *et al.* (2000), jumlah kloroplas sel penjaga menentukan tingkat ploidi suatu tanaman. Sebagai contoh tanaman semangka diploid mempunyai jumlah kloroplas sel penjaga sebanyak 11 – 12, yaitu sekitar dua kali lipat dari tanaman haploidnya dengan jumlah 6 – 7.

Pada umumnya, perubahan genetik yang mencakup perubahan tingkat ploidi, dipengaruhi oleh adanya pembelahan sel yang tinggi yang disebabkan oleh aktivitas zat pengatur tumbuh (sitokinin, auksin) yang sangat kuat. Dilaporkan bahwa tingginya tingkat abnormalitas bibit hasil kultur jaringan, sebagai akibat dari perubahan genetik disebabkan oleh intensifnya penggunaan auksin dalam konsentrasi yang tinggi (EEUWENS *et al.*, 2002). Sebaliknya, dalam penelitian ini digunakan zat penghambat tumbuh, yaitu paclobutrazol yang berperan dalam menghambat aktivitas pembelahan sel sehingga perubahan genetik (dalam hal ini tingkat ploidi) tidak terjadi.



Gambar 6. Pengaruh paclobutrazol terhadap tingkat ploidi kultur purwoceng yang digambarkan dalam jumlah kloroplas sel penjaga stomata

Figure 6. Effect of paclobutrazol on the ploidy level of pruatjan cultures represented by number of chloroplast of stomata guard cells



Gambar 7. Penampilan kloroplas sel penjaga stomata dari kultur purwoceng yang disimpan dengan paclobutrazol: 0 ppm (A), 1 ppm (B), 3 ppm (C), dan 5 ppm (D)

Figure 7. Chloroplast performance of stomata guard cell of prutjan cultures preserved with paclobutrazol of 0 ppm (A), 1 ppm (B), 3 ppm (C), and 5 ppm (D)

KESIMPULAN

Pengenceran media penyimpanan tidak berpengaruh namun paclobutrazol berpengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan kultur purwoceng. Namun demikian, paclobutrazol 1 – 5 ppm tidak mampu memperpanjang masa simpan lebih dari 4 bulan bahkan menyebabkan pertumbuhan kultur yang abnormal (roset) pada tahap regenerasi pasca penyimpanan, walaupun tingkat ploidinya terbukti tidak berubah. Untuk memperoleh teknik pertumbuhan minimal yang efektif maka disarankan menggunakan regulator osmotik yang mampu meningkatkan potensi osmotik dalam media dan memperlambat penyerapan nutrisi sehingga masa simpan kemungkinan dapat diperpanjang tanpa menyebabkan pertumbuhan yang abnormal pada tahap regenerasi pasca penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

- AMALIA, NURSALAM, dan N.N. KRISTINA. 2004. Pengaruh BA (*Benzil Adenin*), ABA (*Absisic Acid*), dan manitol terhadap pertumbuhan dan penyimpanan tunas sambang colok (*Aerva sanguinolenta*) secara *in vitro*. Buletin TRO. XV(2): 50-57.
- CATHEY, H.M. 1975. Comparative plant growth-retarding activities of ancymidol with ACPC, phosfon, chlormequat, and SADH on ornamental plant species. Hort Science. 10(3):204-215.
- CHA-UM, S., C. KIRDMANEE, P.X. HUYEN, and T. VATHANY. 2007. Disease-free production and minimal-growth preservation of *in vitro* banana (*Musa* spp.). ISHS

Acta Horticulturae 760: XXVII International Horticultural Congress - IHC2006: II International Symposium on Plant Genetic Resources of Horticultural Crops (Abstract).

- DESRUNAIS, A.B., M. NOIROT and A. CHARRIER. 1992. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 31:105-110.
- DEWI, N. 2002. Perbanyakan dan pelestarian plasma nutfah talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) secara *in vitro*. Tesis S2. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- DOLEZEL, J., M. DOLEZELOVA, and I. VAN DEN HOWE. 1998. A novel method to prepare slides for high resolution chromosome studies in *Musa* spp. INFOMUSA 7(1): 3-4.
- DRIVER, J.A. and A.H. KUNYAKI. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. Hort. Science. 19(4):507-509.
- EEUWENS, C.J., S. LORD, C.R. DONOUGH, V. RAO, G. VALLEJO, and S. NELSON. 2002. Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70:311-323.
- IBRAHIM, M.S.D. 2005. Pengaruh pemberian paclobutrazol terhadap pertumbuhan bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.) dalam penyimpanan *in vitro*. Buletin TRO XVI (2) (Abstrak).
- JONES, K.D., S.M. REED, and T.A. RINEHART. 2007. Analysis of ploidy level and its effects on guard cell length, pollen diameter and fertility in *Hydrangea macrophylla*. HortScience. 42:483-488.
- LESTARI, E.G. dan I. MARISKA. 1997. Kultur *in vitro* sebagai metode pelestarian tumbuhan obat langka. Buletin Plasma Nutfah 2(1): 1-8.
- LESTARI, E.G. dan R. PURNAMANINGSIH. 2005. Penyimpanan *in vitro* tanaman obat daun dewa melalui partumbuhan minimal. Jurnal Agrobiogen 1 (2): 66-72.
- LEUNUFNA, S. 2004. Improvement of the *in vitro* maintenance and cryopreservation of yams (*Dioscorea* spp.). Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Berlin. 12p. Unpublished.
- LYSAK, M.A., M. DELEZOVA, J.P. HARRY, R. SWENNEN, and J. DOLEZEL. 1999. Flowcytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. Theor.Appl.Genet 98:1344-1350.
- MARISKA, I., SUWARNO, dan DJOKO S. DAMARDJATI. 1996. Pengembangan konservasi *in vitro* sebagai salah satu bentuk pelestarian plasma nutfah di dalam bank gen. Seminar Penyusunan Konsep Pelestarian *Ex Situ* Plasma Nutfah Pertanian di Bogor tanggal 18 Desember 1996. Balitbio. Bogor.
- QIN, X. and G.L. ROTINO. 1995. Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of *in vitro*-grown

- androgenic pepper plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 41(2):145-149.
- RAHARDJO, M. 2003. Purwoceng tanaman obat aprodisiak yang langka. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri*. 9(2): 4-7.
- RAHAYU, S. dan N. SUNARLIM. 2002. Koservasi tanaman obat langka purwoceng dengan pertumbuhan minimal. *Buletin Plasma Nutfah*. 8 (1): 29-33.
- ROOSTIKA, I. dan N. SUNARLIM. 2001. Penyimpanan *in vitro* tunas ubi jalar dengan penggunaan paclobutrazol dan ancymidol. *Penelitian Pertanian*. 20:48-56.
- ROOSTIKA, I., N. SUNARLIM, dan V.N. ARIEF. 2005. Teknik penyimpanan kentang hitam secara kultur *in vitro*. *Penelitian Pertanian*. 24(1): 46-52.
- SARIA, N., K. ABAKA, and M. PITRATB. 2000. Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. *Scientia Horticulturae*. 82:265-277.
- SARKAR, D., S. K. KAUSHIKI and P. S. NAIK. 1999. Minimal growth conservation of potato microplants: silver thiosulfate reduces ethylene-induced growth abnormalities during prolonged storage *in vitro*. *Plant Cell Reports*. 18 (11): 897-903.
- SESWITA, D., AMALIA, dan E. HADIPOENTYANTI. 2003. Konservasi *in vitro* panili (*Vanilla planifolia* Andrews.) melalui pertumbuhan minimal. *Buletin TRO*. XIV(1): 1-7.
- SUNARLIM, N. dan N. ZURAIDA. 2001. Penyimpanan ubi kayu secara *in vitro* dengan pertumbuhan minimal. *Buletin Plasma Nutfah* 7(2):7-12. Komisi Nasional Plasma Nutfah. Badan Litbang Pertanian, Jakarta.
- SUNARLIM, N. dan I. ROOSTIKA. 2003. Penggunaan zat penghambat tumbuh dan regulator osmotik manitol dalam penyimpanan ubi-ubian secara kultur jaringan. *Prosiding Seminar Teknologi Inovatif Agribisnis Kacang-kacangan dan Umbi-umbian untuk Mendukung Ketahanan Pangan*. BALITKABI. Malang.
- SUNARLIM, I. ROOSTIKA, dan V.N. ARIEF. 2004. Penyimpanan *in vitro* gambili melalui pertumbuhan minimal. *Prosiding Seminar Kinerja Penelitian Mendukung Agribisnis Kacang-kacangan dan Umbi-umbian*. BALITKABI. Malang.
- SYAHID, S.F., O. ROSTIANA, dan M. ROHMAH. 2004. Pengaruh NAA dan IBA terhadap perakaran pruatjan (*Pimpinella alpina* Molk.) *in vitro*. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 11(4): 146-151.
- SYAHID, S.F. 2007. Pengaruh retardan paclobutrazol terhadap pertumbuhan temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza*) selama konservasi *in vitro*. *Jurnal Litri*. 13 (3): 93-97.