

KRIOPRESERVASITANAMAN PURWOCENG (*Pimpinella pruatjan* Molk.)
DENGAN TEKNIK VITRIFIKASI
[Cryopreservation of Pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Molk.) by Vitrification Technique]

I Roostika¹, Darwati dan R Megia

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian
Jalan Tentara Pelajar 3A Bogor-16111 Telp. 0251-8337975, Fax. 0251-8338820
HP 08129839661, E-mail: ikatambunan@yahoo.com

ABSTRACT

Pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Molk.) is an Indonesian endangered medicinal plant that included in Appendix I based on CITES. Therefore it is a highly protected species. To avoid extinction of this plant, it is very important to conserve the plant. *In vitro* conservation is more suitable since this plant is difficult to be cultivated outside of its habitat. Cryopreservation technique may conserve this material for a long-term period. The objectives of this research were to find optimized treatments for pre culture, loading, and dehydration on cryopreservation of pruatjan. The research was conducted at Tissue Culture Laboratory in Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, started from May to November 2007. Pre culture was conducted using DKW basal media that added by sucrose at the level of 0.3, 0.4, and 0.5M for one and three days incubation. Loading was conducted in DKW basal media containing 2M glycerol and 0.4M sucrose for 15, 30, and 45 minutes duration time. Dehydration was conducted in several cryoprotectants, namely PVS1 (22% glycerol + 13% propylene glycol + 13% ethylene glycol + 6% DMSO + 3% sucrose), PVS2 (30% glycerol + 15% ethylene glycol + 15% DMSO + 0.4M sucrose), PVS3 (50% glycerol + 50% sucrose), and PVS4 (35% glycerol + 20% ethylene glycol + sucrose 0.6M). Result showed that pruatjan could be preserved through cryopreservation by vitrification method. The best pre culture was using 0.3 M sucrose for one day, the best loading was 30 minutes, while the best cryoprotectant was PVS2 with 90% success before freezing and 40% after freezing. The success may be improved by applying pre growth treatment, optimizing temperature of thawing, modification of recovery media and incubation condition.

Kata Kunci: Kriopreservasi, purwoceng, pruatjan, *Pimpinella pruatjan* Molk., vitrifikasi.

PENDAHULUAN

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) adalah tanaman obat langka asli Indonesia dengan kategori *endangered* atau hampir punah (Rifai *et al.*, 1992). Tanaman tersebut bernilai ekonomis tinggi yang berkhasiat obat sebagai afrodisiak (meningkatkan gairah seksual dan menimbulkan ereksi), diuretik (melancarkan saluran air seni), dan tonik (meningkatkan stamina tubuh). Purwoceng hidup secara endemik dan sulit dibudidayakan di luar habitat aslinya. Rahardjo (2003) dan Syahid *et al.* (2004) melaporkan bahwa saat ini tanaman tersebut hanya tersisa di areal petani yang sangat sempit yaitu di Desa Sekunang, Dataran Tinggi Dieng. Dewasa ini, tanaman ini bahkan termasuk dalam Appendix I berdasarkan CITES (*Convention on International Trading in Endangered Species of Wild Flora and Fauna*) yang berarti sangat dilindungi.

Upaya konservasi *in situ* (pada habitatnya) hampir tidak mungkin dilakukan karena habitat asli tanaman ini sudah punah dengan rusaknya hutan konservasi sebagai akibat kegiatan eksploitasi yang berlebihan. Dengan demikian, konservasi *ex situ* (di luar habitatnya) lebih sesuai untuk diterapkan.

Konservasi *ex situ* di lapangan menghadapi kendala karena tanaman purwoceng sulit dibudidayakan di luar habitatnya karena memerlukan persyaratan agronomis yang spesifik. Selain itu, konservasi di lapangan menghadapi resiko hilangnya populasi tanaman tersebut karena cekaman biotik dan abiotik. Pemeliharaan tanaman di lapangan juga akan membutuhkan area, tenaga, waktu, dan biaya yang besar.

Teknologi kultur *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. Selain itu, koleksi dasar, dapat diterapkan teknik kriopreservasi untuk penyimpanan jangka panjang (Katha, 1985).

Menurut Grout (1995), teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan bahan tanaman dalam suhu yang sangat rendah, yaitu -160 hingga -180°C (nitrogen fase uap) bahkan sampai -196°C (nitrogen

fase cair). Penyimpanan dengan pembekuan dalam nitrogen cair merupakan metode yang potensial untuk penyimpanan jangka panjang plasma nutfah tumbuhan (Bajaj, 1979; Withers, 1980; Towill dan Jarret, 1992). Dengan kriopreservasi, pembelahan sel dan proses metabolisme dalam sel, jaringan atau organ yang disimpan dapat dihentikan sehingga bahan tanaman dapat disimpan tanpa terjadi modifikasi atau perubahan dalam waktu yang tidak terbatas (Bhoj wani dan Razdan, 1983; Ashmore, 1997).

Beberapa tahapan yang dapat diterapkan dalam penyimpanan secara kriopreservasi adalah perlakuan pratumbuh, prakultur, *loading* (pemuatan), dehidrasi jaringan, pembekuan, *thawing* (pelelehan), dan *recovery* (pemulihan) (Roostika dan Mariska, 2004). Jenis-jenis tanaman yang telah berhasil disimpan secara kriopreservasi adalah tanaman kentang (Hirai dan Sakai, 1999a), ubi jalar (Towill dan Jaret, 1992), jeruk (Sakai *et al.*, 1990), kiwi (Bachiri *et al.*, 2001) dan pisang (Panis *et al.*, 2000).

Teknik kriopreservasi pada tanaman purwoceng belum pernah dilaporkan. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perlakuan yang optimal dari tiap-tiap tahapan kriopreservasi yang meliputi perlakuan prakultur, *loading*, dehidrasi baik sebelum dan setelah pembekuan dalam nitrogen cair.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) Bogor pada bulan Mei hingga November 2007. Bahan tanaman sebagai sumber eksplan adalah tunas *in vitro* purwoceng yang dipelihara dalam media regenerasi yang berupa media DKW (Driver dan Kuniyaki, 1984) + BA 5 ppm + thidiazuron 0,2 ppm + arginin 200 ppm yang disubkultur secara rutin, maksimal setiap dua bulan. Eksplan yang digunakan berupa tunas pucuk yang berukuran 2 - 3 mm. Tahapan percobaan meliputi 1) Perlakuan prakultur, 2) Perlakuan *loading*, 3) Perlakuan dehidrasi dan pembekuan jaringan (Gambar 1). Untuk semua tahapan, respon yang diamati adalah daya tumbuh dan jumlah total daun. Daya tumbuh ditandai dengan pertumbuhan tunas, pembentukan

daun, akar atau struktur kalus. Daya tumbuh dihitung dengan membagi jumlah eksplan yang mampu tumbuh terhadap jumlah total eksplan yang bertahan hidup dikalikan 100%. Data akan ditampilkan dalam bentuk rerata dan standar deviasi.

Perlakuan Prakultur

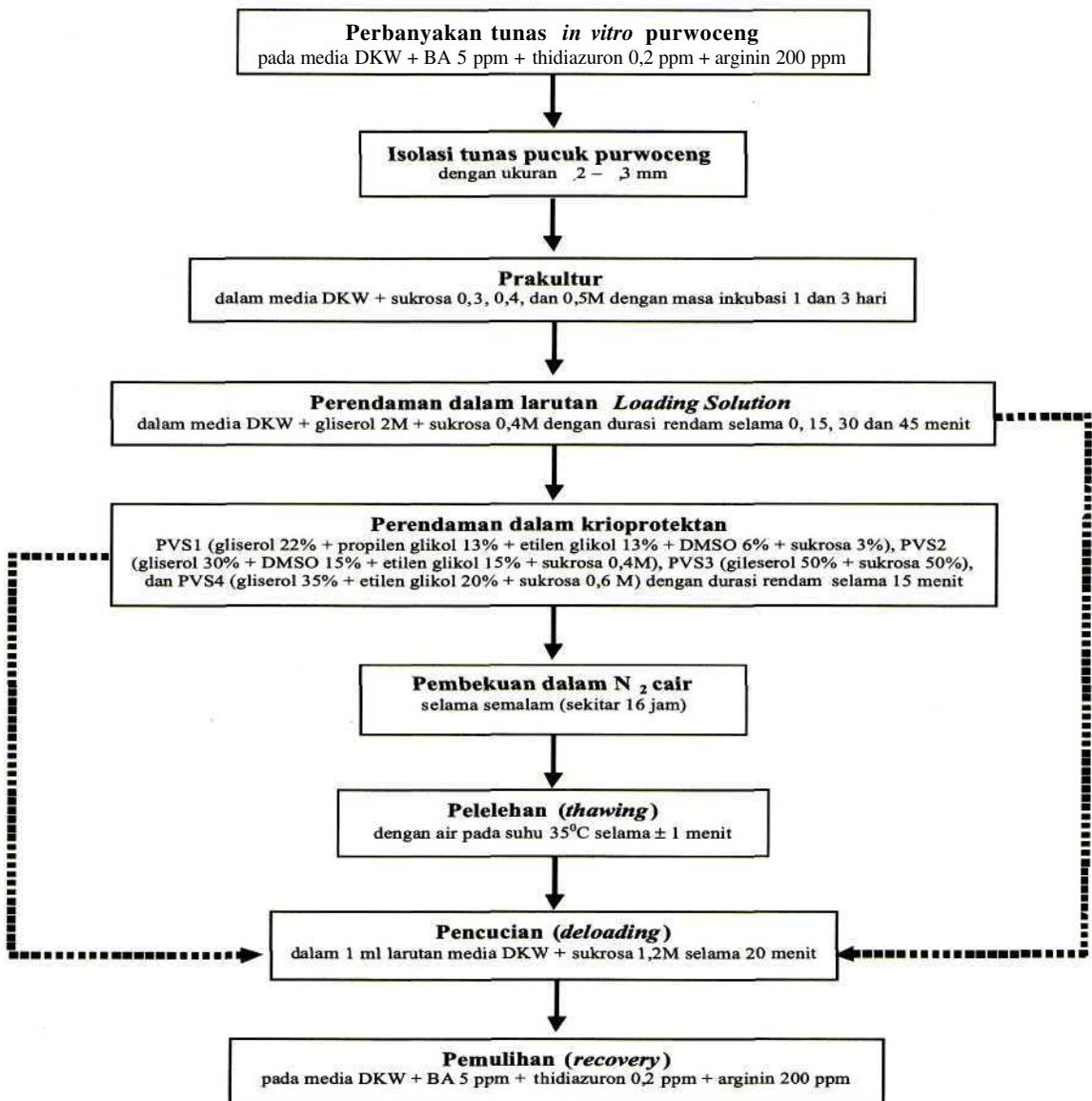
Eksplan ditanam pada media DKW dengan penambahan sukrosa pada taraf 0,3, 0,4 dan 0,5M. Eksplan diinkubasi dalam *growth chamber* dengan suhu 10°C dalam kondisi gelap. Masa inkubasi yang diujikan adalah selama satu dan tiga hari. Setelah periode prakultur, kultur dipindah ke media regenerasi dan diinkubasikan pada suhu 20°C dengan fotoperiodisitas 16 jam terang dan intensitas cahaya 800 - 1000 lux. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali dan setiap ulangan terdiri atas lima eksplan. Perlakuan yang terbaik akan diterapkan pada tahapan penelitian selanjutnya.

Perlakuan *Loading*

Mula-mula, eksplan diprakultur dengan menerapkan perlakuan prakultur yang terbaik berdasarkan percobaan sebelumnya. Setelah itu, kultur *di-loading* dalam media DKW dengan penambahan gliserol 2M dan sukrosa 0,4M. Durasi *loading* yang diujikan adalah selama 0 (kontrol), 15,30, dan 45 menit. Setelah itu, eksplan direndam dalam larutan *deloading*, yaitu larutan DKW dengan penambahan sukrosa 1,2M selama 20 menit sebelum ditanam pada media regenerasi. Sebelum dan sesudah perlakuan *loading*, kultur diinkubasi pada suhu 20°C dan fotoperiodisitas 16 jam terang dengan intensitas cahaya 800 - 1000 lux. Perlakuan kontrol adalah eksplan yang diprakultur tanpa direndam dalam larutan *loading*. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali dan setiap ulangan terdiri atas lima eksplan. Perlakuan yang terbaik akan diterapkan pada tahapan penelitian berikutnya.

Perlakuan Dehidrasi dan Pembekuan Jaringan

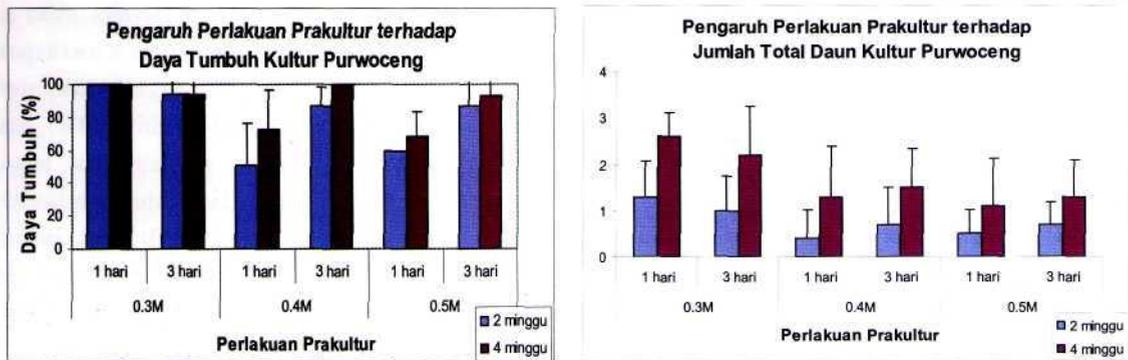
Mula-mula, eksplan diprakultur dan *di-loading* dengan menggunakan perlakuan terbaik berdasarkan percobaan sebelumnya. Setelah itu, kultur didehidrasi dengan menggunakan 4 macam larutan vitrifikasi, yaitu 1) PVS1 (gliserol 22% + propilen glikol 13% + etilen glikol 13% + DMSO 6% pada media dengan sukrosa 3%), 2) PVS2 (gliserol 30% + DMSO 15% + etilen glikol



Gambar 1. Diagram alir percobaan kriopreservasi tunas purwoceng dengan teknik vitrifikasi.

15% pada media dengan sukrosa 0,4M), 3) PVS3 (gliserol 50% dalam media dengan sukrosa 50%); dan 4) PVS4 (gliserol 35% + etilen glikol 20% pada media dengan sukrosa 0,6M) sebagaimana yang dilaporkan oleh Sakai (1993). Durasi perendaman dalam larutan dehidrasi adalah 15 menit. Setelah itu, kultur (yang sudah berada di dalam tabung krio) direndam dalam nitrogen cair (-196°C) selama semalam kemudian dilelehkan pada suhu 35°C dan selanjutnya direndam dalam larutan *deloading* (DKW + sukrosa 1,2M)

selama 20 menit sebelum dipindahkan ke media regenerasi. Setelah tahapan kriopreservasi lengkap dilakukan, maka eksplan diinkubasikan pada suhu 20°C dalam keadaan gelap selama dua minggu. Setelah itu, kultur diinkubasikan pada kondisi fotoperiodisitas 16 jam terang dengan intensitas cahaya 800 - 1000 lux. Sebagai perlakuan kontrol adalah kultur yang tidak direndam dalam nitrogen cair. Setiap perlakuan diulang sebanyak minimal tiga kali dan setiap ulangan terdiri atas lima eksplan.



Gambar 2. Pengaruh perlakuan prakultur pada beberapa taraf sukrosa dengan masa inkubasi yang berbeda terhadap persentase daya tumbuh dan jumlah total daun kultur purwoceng, umur 2 dan 4 minggu.

HASIL

Perlakuan Prakultur

Hasil percobaan prakultur menunjukkan bahwa tingkat molaritas dan masa inkubasi berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur purwoceng. Terdapat kecenderungan bahwa semakin tinggi taraf sukrosa, semakin tinggi pula pengaruh penghambatannya. Namun demikian, semakin lama masa inkubasi perlakuan prakultur maka semakin tinggi pula daya tumbuh kultur. Jaringan tunas pucuk purwoceng terbukti toleran terhadap sukrosa pada taraf tertinggi, yaitu 0,5M.

Berdasarkan persentase daya tumbuh, perlakuan sukrosa 0,3M selama satu hari dan sukrosa 0,4M selama 3 hari merupakan perlakuan terbaik. Namun demikian berdasarkan jumlah total daun yang terbentuk, perlakuan sukrosa 0,3M selama satu hari merupakan perlakuan terbaik (Gambar 2). Pertumbuhan eksplan dari perlakuan tersebut mempunyai kecepatan yang paling tinggi (Foto 1). Dengan demikian, perlakuan sukrosa 0,3M dengan masa inkubasi satu hari diterapkan pada tahap penelitian selanjutnya, yaitu percobaan *loading*.

Perlakuan Loading

Hasil percobaan *loading* menunjukkan bahwa perlakuan durasi rendam selama 45 menit menyebabkan hampir 30% jaringan tunas purwoceng memutih dan mati (Foto 2). Durasi rendam selama 30 menit merupakan perlakuan yang terbaik karena memberikan persentase daya tumbuh yang tinggi (lebih dari 90%) dengan kecepatan pertumbuhan yang tidak

berbeda dengan perlakuan kontrol (Gambar 3). Untuk selanjutnya, perlakuan *loading* selama 30 menit diterapkan pada percobaan dehidrasi.

Hasil percobaan dehidrasi dan pembekuan jaringan menunjukkan bahwa jaringan tunas purwoceng mempunyai respon yang berbeda-beda terhadap larutan krioprotektan yang diujikan. Persentase daya hidup dan daya tumbuh berangsur-angsur turun dari perlakuan prakultur, *loading*, dan selanjutnya dehidrasi. Dari keempat macam larutan dehidrasi yang digunakan, larutan PVS1 dan PVS2

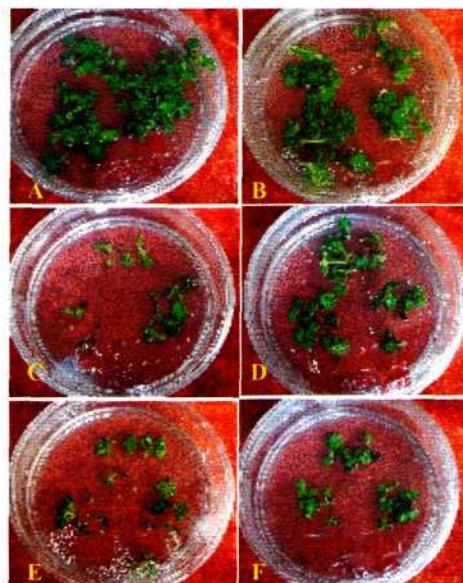


Foto 1. Pertumbuhan kultur purwoceng (umur 4 minggu) setelah perlakuan prakultur: 0,3M 1 hari (A), 0,3M 3 hari (B), 0,4M 1 hari (C), 0,4M 3 hari (D), 0,5M 1 hari (E), dan 0,5M 3 hari (F).

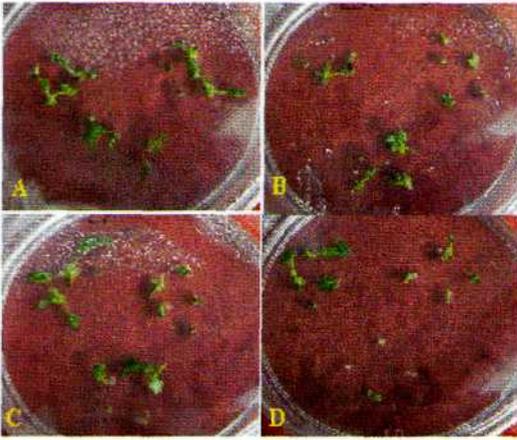


Foto 2. Pertumbuhan kultur purwoceng (umur 4 minggu) setelah perlakuan *loading* selama durasi rendam tertentu: A. 0 menit, B. 15 menit, C. 30 menit, dan D. 45 menit.

memberikan daya tumbuh yang tinggi (sekitar 90%) sedangkan larutan PVS3 dan PVS4 memberikan daya tumbuh yang rendah, yaitu kurang dari 40%. Setelah pembekuan dalam nitrogen cair, daya tumbuh yang tertinggi diperoleh dari perlakuan PVS2 (40%) dan selanjutnya PVS4 (kurang dari 10%) sedangkan dari perlakuan PVS1 dan PVS3 tidak terdapat kultur yang bertahan hidup (Gambar 4). Kultur yang tidak mampu pulih menjadi pudar warnanya dan akhirnya berwarna putih sedangkan kultur yang bertahan hidup mampu tumbuh lebih lanjut. Pertumbuhan kultur tersebut ditandai dengan munculnya daun baru yang berasal dari meristem (Foto 3). Setelah 4 minggu, pertumbuhan kultur selanjutnya mengalami stagnasi di mana tunas

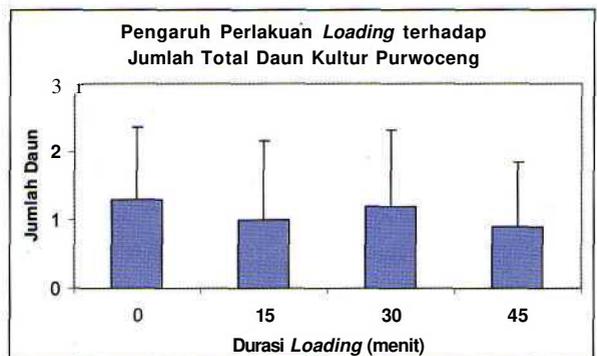
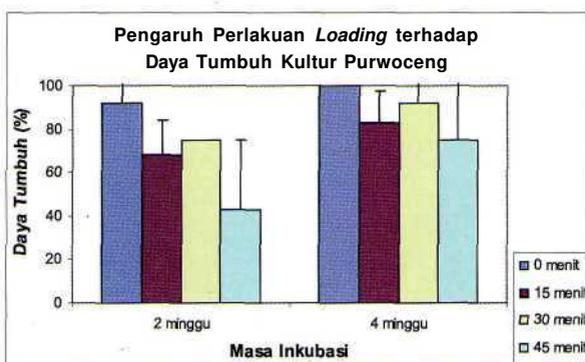
tidak tumbuh lebih lanjut dan daun baru tidak muncul. Untuk memacu pertumbuhannya maka dilakukan subkultur ke media segar. Hasil menunjukkan bahwa kultur tidak mampu tumbuh lebih lanjut dan bahkan mencoklat dan akhirnya mati.

PEMBAHASAN

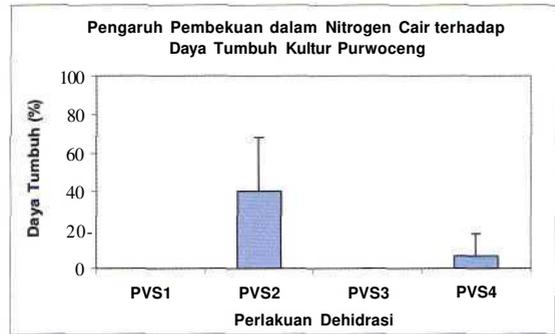
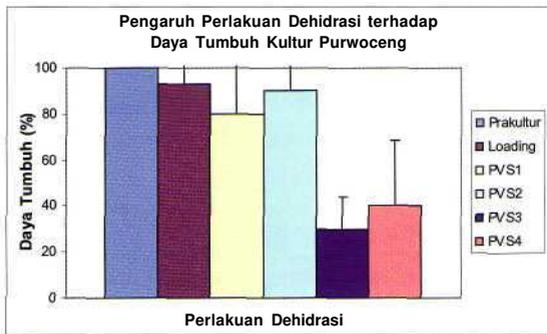
Perendaman jaringan ke dalam krioprotektan secara langsung dapat menyebabkan efek merusak sel karena stres osmotik yang disebabkan oleh tingginya molaritas larutan dehidrasi. Dengan demikian, jaringan memerlukan perlakuan khusus untuk meningkatkan toleransi terhadap stres osmotik akibat dari tingginya konsentrasi (molaritas) larutan krioprotektan. Tahapan perlakuan awal yang dapat diterapkan sebelum perlakuan dehidrasi adalah pratumbuh, prakultur, dan *loading*.

Perlakuan Prakultur

Penerapan perlakuan prakultur dengan menggunakan sukrosa dimaksudkan untuk memberikan kesempatan bagi sel untuk dapat meningkatkan fleksibilitas membran sel. Fleksibilitas membran sel sangat berperan dalam proses dehidrasi cairan dalam sel supaya tidak terjadi plasmoliosis yang irreversibel. Menurut Gnanapragasam dan Vasil (1992), prakultur sel dapat menyebabkan penurunan volume vakuola yaitu dengan cara redistribusi vakuola sentral yang besar menjadi sejumlah vesikel yang lebih kecil. Dengan demikian kristalisasi cairan dalam sel dapat dihindari sehingga proses pembekuan tidak akan menyebabkan sel mengalami *injury* (luka yang serius). Luka yang



Gambar 3. Pengaruh perlakuan *loading* dengan durasi rendam yang berbeda-beda terhadap daya tumbuh dan jumlah total daun dari kultur purwoceng, umur 2 dan 4 minggu.



Gambar 4. Pengaruh perlakuan dehidrasi dari beberapa macam krioprotektan sebelum dan setelah pembekuan dalam nitrogen cair (-196°C) terhadap daya tumbuh kultur purwoceng, umur 4 minggu.

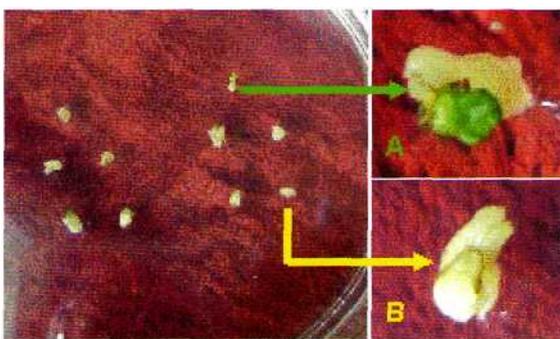


Foto 3. Pertumbuhan kultur purwoceng (umur 4 minggu) setelah pembekuan dalam nitrogen cair (-196°C): A. Kultur yang bertahan hidup dan mampu tumbuh serta B. Kultur yang tidak bertahan hidup (mati).

serius tidak diharapkan terjadi karena akan mempersulit sel dalam proses *recovery* (pemulihan) atau bahkan dapat menyebabkan kematian sel.

Pada percobaan prakultur, peningkatan taraf sukrosa menyebabkan penurunan tingkat pertumbuhan kultur purwoceng. Hal ini disebabkan oleh tingginya molaritas media dengan sukrosa taraf tinggi sehingga sel mengalami plasmolisis di mana proses keluarnya air dari dalam sel justru lebih dominan daripada proses penyerapan nutrisi. Sebagaimana sifat membran sel yang semi permeabel, sel akan menyerap nutrisi (bersama dengan penyerapan air) jika molaritas larutan pada lingkungannya adalah lebih rendah daripada molaritas cairan di dalam sel.

Lamanya masa inkubasi perlakuan prakultur berpengaruh positif terhadap pertumbuhan kultur. Hal ini diduga disebabkan oleh proses adaptasi jaringan

yang lebih lanjut sehingga proses penyerapan nutrisi dari media tidak didominasi oleh proses dehidrasi jaringan. Selain itu, kandungan sukrosa yang berlimpah dalam media prakultur kemungkinan dimanfaatkan sebagai sumber energi (karbon) bagi pertumbuhan kultur selanjutnya.

Perlakuan *Loading*

Selain perlakuan prakultur, perlakuan *loading* juga diterapkan dengan maksud untuk meningkatkan keberhasilan kriopreservasi. Pada kondisi tersebut, sel diperlakukan dengan larutan bermolaritas lebih tinggi daripada perlakuan prakultur untuk mengadaptasikan sel atau jaringan pada larutan dengan molaritas yang lebih tinggi lagi, yaitu larutan krioprotektan.

Pada tahap *loading*, jaringan diperlakukan dengan gliserol dan juga sukrosa pada taraf yang lebih tinggi. Kedua komponen tersebut merupakan komponen yang terkandung dalam larutan krioprotektan yang akan digunakan pada tahap dehidrasi. Kondisi tersebut memberikan kesempatan lanjut bagi sel untuk meningkatkan fleksibilitas membrannya dan menyebabkan proses dehidrasi secara perlahan-lahan sehingga sel tidak akan pecah. Perendaman jaringan dalam larutan *loading* dilaporkan efektif dapat meningkatkan osmotoleransi jaringan pada beberapa macam tanaman seperti pada talas (Takagi *et al*, 1997), kentang (Hirai dan Sakai, 1999a), mentha (Hirai dan Sakai, 1999b), dan wasabi (Matsumoto *et al*, 1994).

Berdasarkan hasil percobaan *loading*, tampak bahwa semakin lama durasi rendam maka semakin turun pula tingkat pertumbuhan kultur. Sebagaimana diketahui

bahwa plasmolisis dapat terjadi pada lingkungan dengan molaritas yang tinggi, dan durasi yang lebih lama akan memperparah tingkat plasmolisis sel. Durasi rendam selama 45 menit ternyata dapat menyebabkan penurunan daya hidup kultur hingga 30% sehingga perlakuan tersebut tidak direkomendasikan. Perlakuan yang optimal adalah durasi rendam 30 menit.

Hasil percobaan *loading* menunjukkan adanya kejanggalan pada respon kultur dari durasi rendam 15 menit yang lebih rendah daripada durasi rendam 30 menit. Hal ini diduga disebabkan oleh keragaman eksplan yang cukup tinggi. Dalam hal ini, jaringan kultur purwoceng tampak sangat sensitif terhadap perlakuan percobaan kriopreservasi sehingga diperoleh keragaman respon yang tinggi pula.

Perlakuan Dehidrasi dan Pembekuan Jaringan

Untuk melindungi jaringan tanaman dari pengaruh negatif pada saat pembekuan diperlukan kondisi sel yang mengalami dehidrasi. Penggunaan krioprotektan dapat memelihara ketuhanan membran dengan cara meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi. Kondisi dehidrasi yang optimal dapat dicapai dengan menggunakan larutan krioprotektan pada jenis, konsentrasi dan lama perendaman yang sesuai. Krioprotektan yang baik digunakan adalah yang dapat melindungi jaringan selama pembekuan tanpa bersifat toksik terhadap jaringan itu sendiri.

Larutan PVS3 dan PVS4 tampaknya bersifat toksik daripada larutan PVS1 dan PVS2. Diduga bahwa konsentrasi gliserol yang lebih tinggi dalam larutan PVS3 (50%) dan PVS4 (35%) daripada dalam PVS1 (22%) dan PVS2 (30%) menjadi penyebab utama toksisitas jaringan tersebut. Menurut Kartha (1985), gliserol dan DMSO merupakan senyawa krioprotektan yang dapat masuk ke dalam sel (*permeating agent*) sedangkan sukrosa merupakan senyawa krioprotektan yang tidak dapat masuk ke dalam sel (*non permeating agent*) melainkan berada di ruang inter seluler. Selain itu secara visual, viskositas dari PVS3 dan PVS4 tampak lebih kental daripada PVS 1 dan PVS2. Hal ini kemungkinan berhubungan dengan molaritas total dari komponen krioprotektan dalam larutan tersebut. Diduga bahwa molaritas yang terlalu tinggi tersebut menyebabkan dehidrasi yang berlebihan sehingga terjadi plasmolisis

yang irreversibel. Menurut Towill (1991) dalam Reinhoud *et al.* (2000), sel yang terdehidrasi terlalu kuat dapat menyebabkan plasmolisis yang kuat pula sehingga berakibat terhadap perubahan pH, interaksi makromolekuler dan peningkatan konsentrasi zat elektrolit.

Setelah pembekuan jaringan dalam nitrogen cair, PVS2 menyebabkan tingkat keberhasilan yang lebih tinggi dibandingkan dengan PVS1. Turunnya persentase daya hidup kultur dari perlakuan PVS1 diduga karena jaringan kurang mengalami dehidrasi sehingga sel-sel dalam jaringannya masih banyak mengandung air. Air tersebut menjadi pemicu terbentuknya es baik intra- dan ekstra-seluler. Formasi es intraseluler mutlak bersifat letal sedangkan formasi es ekstraseluler dapat juga merusak sel karena daya mekanis dari kristal es yang tumbuh, gaya adesi kristal es terhadap membran, interaksi listrik yang disebabkan oleh perbedaan solubilitas ion pada fase es dan cair, formasi gelembung udara intraseluler, luka kimiawi yang berhubungan dengan peroksidase lipid dan perubahan pH pada lokasi tertentu (Grout, 1995). Turunnya persentase daya hidup setelah pembekuan oleh perlakuan PVS2 diduga karena pengaruh perlakuan pelelehan. Pada saat pelelehan, kontraksi osmotik dapat menyebabkan vesikulasi endositotik yang irreversibel yang dapat mengakibatkan sel menjadi lisis karena bahan membran yang baru tidak mampu memfasilitasi deplasmolisis (Steponkus, 1984 dalam Reinhoud *et al.*, 2000).

Tingkat keberhasilan kriopreservasi pada penelitian ini masih rendah. Beberapa upaya yang mungkin dapat meningkatkan keberhasilan tersebut adalah penerapan perlakuan pratumbuh, optimasi suhu pelelehan, modifikasi media pemulihan, dan modifikasi lingkungan inkubasi. Hirai dan Sakai (1999b) melaporkan bahwa perlakuan pratumbuh dengan suhu 4°C dapat meningkatkan daya tumbuh eksplan mentha sebesar 70%. Selanjutnya, hasil penelitian kriopreservasi ubi jalar menunjukkan bahwa suhu pelelehan 22°C lebih baik daripada 40°C (Roostika *et al.*, 2004). Kondisi lingkungan inkubasi juga dilaporkan dapat menentukan keberhasilan hidup kultur pasca pembekuan. Pennycooke dan Towill (2000) mencobakan kultur diinkubasikan dengan pencahayaan secara

bertahap, yaitu mula-mula inkubasi dilakukan dalam keadaan gelap. Setelah itu, media dikondisikan dengan penambahan NH_4^+ (40 mmol m^{-1}V) dan akhirnya dengan pencahayaan biasa (60 mmol nrV). Selain itu, dapat digunakan modifikasi media pemulih seperti pengenceran garam tertentu. Penggunaan media dengan kandungan ion NH_4^+ setengah kali lipat dari media MS terbukti mampu meningkatkan keberhasilan tumbuh kultur ubi jalar pasca pembekuan. Menurut Pennycooke dan Towill (2001), ion NH_4^+ bersifat merusak pada suhu rendah dan dapat menghambat proses pemulihan kultur yang mengalami luka karena pembekuan.

Fenomena stagnasi dari pertumbuhan kultur purwoceng pasca-kriopreservasi kemungkinan disebabkan oleh munculnya zat-zat yang menghambat pertumbuhan kultur. Dilaporkan bahwa selama proses kriopreservasi, dapat terbentuk formasi radikal bebas yang bersifat toksik. Radikal bebas yang dapat terbentuk misalnya radikal hidroksil (OH), superoksida (O_2), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Dumet dan Benson, 2000). Radikal bebas dapat menyerang fraksi lipid pada membran dan menghasilkan lipid peroksida dan selanjutnya dapat terurai menjadi senyawa produk oksidasi sekunder yang beracun (Benson *et al.* 1992; Dumet dan Benson, 2000). Untuk mengatasi zat-zat penghambat tumbuh termasuk radikal bebas maka ke dalam media pemulih dapat ditambahkan zat antioksidan, misalnya charcoal, PVP, asam askorbat, dan asam sitrat.

KESIMPULANDANSARAN

Teknik kriopreservasi dapat diterapkan untuk penyimpanan jangka panjang tanaman purwoceng. Perlakuan terbaik untuk setiap tahapan kriopreservasi adalah prakultur dengan sukrosa 0,3 M selama satu hari, durasi rendam dalam larutan *loading* (DKW + gliserol 2M + sukrosa 0,4M) selama 30 menit, dan krioprotektan yang paling sesuai adalah PVS2 (DKW + gliserol 30% + DMSO 15% + etilen glikol 15% + sukrosa 0,4M) dengan persentase daya tumbuh mencapai 90% (sebelum pembekuan) dan 40% (setelah pembekuan).

Pengembangan metode kriopreservasi purwoceng dapat diupayakan untuk meningkatkan keberhasilan. Keberhasilan kriopreservasi tersebut

dapat ditingkatkan dengan menerapkan penerapan perlakuan pratumbuh, optimasi suhu pelelehan, modifikasi media pemulih, dan modifikasi lingkungan inkubasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Badan Litbang Pertanian yang telah mendanai penelitian ini pada program Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) 2007. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. T. Niino dan Dr. K. Fukui (*National Institute of Agrobiological Science, Japan*) atas pelatihan teknik kriopreservasinya dan Dr. Juliarni atas bantuannya dalam alih bahasa Jepang-Indonesia, serta semua pihak yang turut membantu keberhasilan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashmore SE. 1997. *Status Report on The Development and Application of In-Vitro Techniques for The Conservation and Use of Plant Genetic Resources*, 67. IPGRI, Queensland, Australia.
- Bachiri Y, GQ Song, P Plessis, A Shoar-Ghaffari, T Rekab and C Morisset. 2001. Routine Cryopreservation of Kiwifruit (*Actinidia* spp.) Germplasm by Encapsulation-Dehydration: Importance of Plant Growth Regulators. *CryoLetters* 22, 61-74.
- Bajaj YPS. 1979. Technology and Prospects of Cryopreservation of Germplasm. *Euphytica* 28,267-285.
- Benson EE, PT Lynch and J Jones. 1992. Detection of lipid peroxidation products in cryoprotected and frozen rice cells: consequences for post-thaw survival. *Plant Science* 110,249-258.
- Bhojwani SS and MK Razdan. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practise*, 502. Elsevier. Amsterdam. New York.
- Driver JA and AH Kuniyuki. 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. *Hort. Science* 19, 507-509.
- Dumet D and EE Benson. 2000. The use of physical and biochemical studies to elucidate and reduce cryopreservation-induced damage in hydrated/desiccated plant germplasm. In: F Engelmann and H Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*. 43-S6. IPGRI Ramsataty.
- Gnanapragasam S and IK Vasil. 1992. Cryopreservation of Immature Embryos, Embryonic Callus and Cell Suspension Cultures of Gramineous Species. *Plant Science* 83,205-215.

- Grout BWW. 1995.** Introduction to the *In Vitro* Preservation of Plant Cells, Tissues and Organs. In: B Grout (Ed.). *Genetic Preservation of Plant Cells In Vitro*, 1-17. Springer Lab Manual Berlin-Heidelberg.
- Hirai D and Sakai A. 1999a.** Cryopreservation of *In Vitro*-Grown Meristems of Potato (*Solanum tuberosum* L.) by Encapsulation-Vitrification. *Potato Research* **42**, 153-160.
- Hirai D and A Sakai. 1999b.** Cryopreservation of *In Vitro*-Grown Axillary Shoot Tip Meristems of Mint (*Mentha spicata* L.) by Encapsulation-Vitrification. *Plant Cell Report* **19**, 150-155.
- Kartha KK. 1985.** Meristem culture and germplasma preservation. In: KK Kartha (Ed.). *Cryopreservation of Plant Cells and Organics*. 116-134. Cre Press. Florida,.
- Leunufna S. 2004.** *Improvement of the in vitro maintenance and cryopreservation of yams (Dioscorea spp.)*, 120. Martin-Luther-Universitat Halle-Wittenberg, Berlin.
- 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.
- Panis B, H Schoofs, S Remy, L Sagi and R Swennen. 2000.** Cryopreservation of Banana Embryogenic Cell Suspensions: An Aid for Genetic Transformation. In: F Engelmann and H Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*, 103-109. IPGRI. Rome-Italy.
- Pennycooke JC and LE Towill. 2000.** Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) by vitrification. *Plant Cell Reports* **19**, 733-737.
- Pennycooke JC and LE Towill. 2001.** Medium alterations improve regrowth of sweet potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) shoot tips cryopreserved by vitrification and encapsulation-dehydration. *CryoLetters* **22**, 381-389.
- Reinoud PJ, FV Iren, and JW Kijne. 2000.** Cryopreservation of Undifferentiated Plant Cells. In: F Engelmann and H Takagi (Eds.). *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm: Current Research Progress and Application*, 91-102. IPGRI. Rome-Italy.
- Rifai MA, Rugayah dan EA Widjaja. 1992.** Thirty Years of The Eroded Species Medicinal Crops. *Floribunda* **28**.
- Rahardjo M. 2003.** Purwoceng Tanaman Obat Aprodisiak yang Langka. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri* **9**, 4-7.
- Roostika I dan I Mariska. 2004.** Pemanfaatan Teknik Kriopreservasi dalam Penyimpanan Plasma Nutfah Tanaman. *Buletin Plasma Nutfah* **9**, 10-18.
- Roostika I, I Mariska, GA Wattimena dan N Sunarlim. 2004.** Penerapan teknik vitrifikasi pada penyimpanan ubi jalar (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) secara kriopreservasi. *Jurnal Penelitian Pertanian* **23**, 117-122.
- Sakai A, S Kobayashi and I Oiyama. 1990.** Cryopreservation of Nucellar Cells of Navel Orange (*Citrus sinensis* Osb. Var Brasiliensis Tanaka) by Vitrification. *Plant Cell Report* **9**, 30-33.
- Sakai A. 1993.** Cryogenic Strategies for Survival of Plant Culture Cells and Meristem Cooled to -196°C. In: A. Sakai (Ed.). *Cryopreservation of Plant Genetic Resources*, 5-26. Japan International Cooperation Agency. Japan.
- Syahid SF, O Rostiana dan M Rohmah. 2005.** Pengaruh NAA dan IBA terhadap perakaran pruatjan (*Pimpinella alpina* Molk.) *in vitro*. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri* **II**, 146-151.
- Takagi H, NT Thinh, OM Isulam, T Senboku and A Sakai. 1997.** Cryopreservation of *In Vitro*-Grown Shoot Tips of Taro (*Colocasia esculenta* L. Schott) by Vitrification. *Plant Cell Report* **16**, 594-599.
- Towill LE and RL Jarret. 1992.** Cryopreservation of Sweet Potato (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) Shoot Tips by Vitrification. *Plant Cell Report* **11**, 175-178.
- Withers LA. 1980.** Preservation of Germplasm in Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. In: IK Vasil(Eds.). *Plant Cell Culture*, 101-136. IRL Press. Washington.