

Pengaruh Sumber Karbon dan Kondisi Inkubasi terhadap Pertumbuhan Kultur *In Vitro* Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.)

Ika Roostika, Ragapadmi Purnamaningsih, dan Arief V. Noviaty

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

ABSTRACT

The Effect of Carbon Source and Culture Condition to the Growth of Pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Molk.) Culture. Ika Roostika, Ragapadmi Purnamaningsih, and Arief V. Noviaty. Pruatjan (*Pimpinella pruatjan* Molk.) is an Indonesian medicinal plant which is categorized as endangered plant and included in Appendix I based on CITES. The *in vitro* conservation techniques have been studied. However, the storage period was very short (4 months) when plant growth retardant and media dilution were applied. Beside that, the residual effect of growth retardant was strong enough so that it needed more than 4 months for recovery. Thus, the use of certain carbon source may prolong the preservation period with shorter time for recovery. The objective of the study was to know the effects of carbon sources (sucrose and mannitol) and culture conditions (culture room and growth chamber) to the growth of pruatjan cultures. This application was hoped to prolong preservation period of pruatjan longer than 4 months and to cut the recovery period after preservation. The study was conducted at Tissue Culture Laboratory in Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development from August 2006 to July 2007. The activities included propagation of *in vitro* shoot grown *in vitro* as explants source, preservation of *in vitro* shoots of pruatjan, and regeneration of the cultures after preservation. The experiment was designed as factorial in Randomized Completely Block Design with 6 replications. The DKW basal media containing 1 ppm BA, 0.2 ppm thidiazuron, and 100 ppm arginine were supplemented with mannitol or sucrose at the level of 1, 2, 3, 4, and 5%. The observed variables were total number of leaves, number of shoot, and number of wilt leaves. The result revealed that pruatjan cultures could be stored longer than 4 months. Generally, the effect of mannitol or sucrose was more dominant than that of cultures condition. The mannitol (1-5%) strongly inhibited the growth of pruatjan cultures so that only a few cultures survived at 7 months preservation period and needed about 1 month for recovery. On the contrary, the effect of sucrose (at the same level) was better than mannitol. The 2.5% sucrose optimally inhibited pruatjan cultures. At that condition, the cultures could be stored for 10 months without morphological changes so that they could recover spontaneously.

Key words: *Pimpinella pruatjan* Molk., carbon sources, culture conditions.

PENDAHULUAN

Purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) merupakan tanaman obat langka asli Indonesia yang bernilai ekonomi tinggi karena berkhasiat obat sebagai afrodisiak, diuretik, dan tonik. Namun, tanaman ini dikategorikan hampir punah (Rifai *et al.* 1992) sehingga perlu dilindungi. Dengan demikian, upaya konservasi harus segera dilakukan.

Konservasi tanaman purwoceng secara *in situ* (pada habitatnya) tidak dapat diandalkan karena habitat aslinya sudah punah dengan rusaknya hutan konservasi sebagai akibat kegiatan eksploitasi yang berlebihan sehingga konservasi *ex situ* (di luar habitatnya) akan lebih sesuai untuk diterapkan. Konservasi *ex situ* di lapang menghadapi kendala. Tanaman ini sulit dibudidayakan di luar habitatnya karena memerlukan persyaratan agronomi yang spesifik. Selain itu, konservasi di lapang menghadapi risiko hilangnya populasi tanaman tersebut karena cekaman biotik dan abiotik. Pemeliharaan tanaman di lapang juga akan membutuhkan area, tenaga, waktu, dan biaya yang besar. Teknik konservasi *in vitro* merupakan teknologi alternatif yang dapat diterapkan untuk menghindari kepunahan tanaman tersebut.

Teknik konservasi *in vitro* dapat dibedakan menjadi tiga macam, yaitu penyimpanan dalam keadaan tumbuh, penyimpanan dengan teknik pertumbuhan minimal, dan penyimpanan secara kriopreservasi (Mariska *et al.* 1996). Teknik konservasi *in vitro* purwoceng telah diteliti. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kultur purwoceng tidak efektif disimpan dengan menggunakan retardan (paclobutrazol dan ancymidol) baik pada media dengan kandungan hara penuh (Rahayu dan Sunarlim 2002) maupun pengencerannya hingga 4 kali (Roostika *et al.* 2007). Melalui teknik tersebut, kultur hanya mampu disimpan selama 4 bulan. Selain itu, efek residu dari retardan ternyata sangat kuat sehingga kultur yang telah disimpan memerlukan waktu lama (lebih dari 4 bulan) pada tahap pemulihan untuk kembali normal pertumbuhannya. Oleh karena itu, diperlukan metode lain untuk memperpanjang masa simpan kultur purwoceng lebih dari 4 bulan dan untuk memperpendek masa pemulihan.

Beberapa hal yang diduga dapat memperpanjang masa simpan kultur purwoceng adalah melalui penurunan temperatur lingkungan seperti suhu dan intensitas cahaya (Hu dan Wang 1983, Withers 1985) serta melalui penggunaan regulator osmotik seperti sukrosa dan manitol (Withers 1985, Bessembinder *et al.* 1993). Penurunan suhu (2-10°C) telah diterapkan pada beberapa macam tanaman, seperti kentang, bawang, dan mentha dengan periode simpan 12 hingga 18 bulan (Keller *et al.* 2006). Selain itu, Sunarlim *et al.* (1999) melaporkan bahwa penggunaan manitol 4% mampu menyimpan kultur ubi jalar selama 10 bulan. Demikian pula, Sarkar dan Naik (1998) melaporkan bahwa kultur kentang dapat disimpan selama 30 bulan dengan menggunakan manitol, sukrosa atau kombinasinya. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penggunaan jenis sumber karbon (sukrosa dan manitol) dan kondisi inkubasi (ruang kultur dan *growth chamber*) yang berbeda terhadap pertumbuhan dan masa simpan serta pemulihan kultur purwoceng setelah penyimpanan *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperpanjang masa simpan kultur purwoceng lebih dari 4 bulan dan memperpendek masa pemulihan kultur setelah penyimpanan.

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, dari bulan Agustus 2006 hingga Juli 2007. Kegiatan penelitian mencakup perbanyakan tunas *in vitro* sebagai sumber eksplan, penyimpanan *in vitro*, dan regenerasi kultur pasca penyimpanan *in vitro*.

Perbanyakan sumber eksplan dilakukan dengan menanam tunas *in vitro* purwoceng pada media regenerasi yang berupa media DKW + BA 1 ppm + thidiazuron 0,2 ppm + arginin 100 ppm. Tindakan subkultur dilakukan secara rutin, maksimal setiap dua bulan hingga diperoleh sejumlah tunas yang memadai untuk percobaan penyimpanan *in vitro*.

Untuk percobaan penyimpanan *in vitro*, terdapat dua macam percobaan. Manitol merupakan regulator osmotik yang kuat aktivitasnya sehingga digunakan terlebih dahulu pada penelitian ini sedangkan sukrosa dicobakan kemudian. Taraf manitol dan sukrosa masing-masing adalah 1, 2, 3, 4, dan 5%. Eksplan yang digunakan adalah tunas tanpa daun. Eksplan tersebut ditanam dalam tabung reaksi (dimensi tinggi 15 cm x diameter 2,5 cm) yang berisi media DKW + BA 1 ppm dengan penambahan manitol atau sukrosa. Volume media untuk tiap-tiap tabung adalah 14 ml. Inkubasi

dilakukan pada dua kondisi, yaitu di ruang kultur dan *growth chamber*. Kondisi di ruang kultur adalah suhu $20\pm 2^\circ\text{C}$, intensitas penyinaran 800-1000 lux dengan fotoperiodisitas 16 jam terang sedangkan kondisi di *growth chamber* adalah $10\pm 1^\circ\text{C}$, intensitas penyinaran 1000 lux dengan fotoperiodisitas 12 jam terang. Rancangan disusun secara faktorial dalam lingkungan Acak Kelompok dengan 6 ulangan. Peubah yang diamati adalah jumlah tunas, jumlah total daun, dan rasio daun segar. Rasio daun segar diperoleh dengan membagi antara daun segar dengan total daun (termasuk daun yang layu) dan dikalikan seratus persen. Data yang diperoleh kemudian dianalisis interaksinya antara kondisi inkubasi (ruang kultur dan *growth chamber*) dengan sumber karbon (manitol dan sukrosa) dengan menggunakan program Minitab Release 14 for Windows (Minitab 2004).

Pemulihan dilakukan setelah periode simpan tertentu atau ketika kegiatan penyimpanan dihentikan. Penyimpanan dihentikan ketika sekitar 50% kultur mengalami kematian, yaitu 7 bulan untuk perlakuan manitol dan 10 bulan untuk perlakuan sukrosa. Pemulihan pasca penyimpanan dilakukan dengan melakukan subkultur tunas *in vitro* ke media regenerasi yang sama dengan media perbanyakan tunas. Tunas *in vitro* yang tidak mengandung daun, langsung disubkultur sedangkan tunas yang mengandung daun, dipotong terlebih dahulu daunnya sebelum disubkultur. Data yang diambil adalah persentase daya hidup dan penampilan visual kultur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, sitokinin berupa BA 1 ppm ditambahkan dalam media yang dicobakan karena berdasarkan studi pendahuluan, penggunaan media tanpa zat pengatur tumbuh tidak cukup mendukung pertumbuhan kultur terlebih lagi ketika zat penghambat tumbuh atau retardan ditambahkan dalam media tersebut. Kondisi demikian akan menyebabkan kultur cepat mengalami kematian.

Manitol merupakan poliol atau gula alkohol yang dapat berfungsi sebagai sumber karbon dan pada taraf yang tinggi dapat berfungsi sebagai regulator osmotik. Sebagai sumber karbon, manitol dapat mendukung pertumbuhan kultur, namun sebagai regulator osmotik, manitol dapat meningkatkan osmolaritas media atau potensial osmotik media sehingga nutrisi yang mengalir ke dalam jaringan tanaman berjalan lambat. Lambatnya aliran nutrisi tersebut dapat menyebabkan penghambatan terhadap pertumbuhan kultur.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan manitol menyebabkan pertumbuhan kultur yang

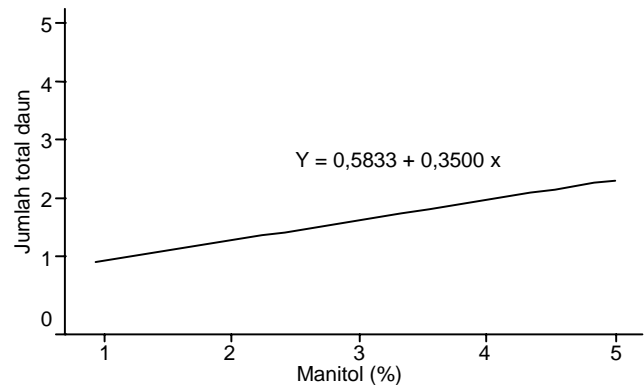
sangat lambat sehingga hanya sebagian kecil kultur yang tumbuh membentuk daun baru. Diduga bahwa pemberian manitol sebagai sumber karbon tidak cukup mendukung pertumbuhan kultur purwoceng. Hal yang serupa juga terjadi pada *transverse thin cell layers* tanaman krisan di mana penggunaan manitol sebagai sumber karbon sangat tidak efektif jika dibandingkan dengan penggunaan sukrosa, glukosa, fruktosa, maltosa, manosa, galaktosa, rafinosa, sorbitol, furanosa, selulosa, silosa, dan laktosa (Da Silva 2004). Fenomena demikian sebenarnya bersifat positif bagi upaya penyimpanan *in vitro* kultur purwoceng karena penghambatan pertumbuhan berpeluang untuk memperpanjang masa simpan.

Pada masa simpan 4 bulan, tampak tidak terdapat interaksi yang nyata antara kondisi inkubasi dengan manitol. Kondisi inkubasi berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan kultur sedangkan taraf manitol tidak berpengaruh nyata. Pertumbuhan kultur purwoceng lebih terhambat di dalam *growth chamber* daripada di ruang kultur. Diduga bahwa penurunan suhu dari 20°C menjadi 10°C dan penurunan fotoperiodisitas dari 16 jam menjadi 12 jam merupakan faktor penyebab dalam penghambatan pertumbuhan kultur tersebut. Fenomena serupa juga terjadi pada penyimpanan *in vitro* tanaman ubi jalar (Jarret dan Gawel 1991) di mana penurunan suhu dari 21°C menjadi 15°C mampu menurunkan tingkat pertumbuhan kultur ubi jalar hingga 50% sedangkan penurunan fotoperiodisitas dari 16 jam menjadi 4 jam menyebabkan ukuran kultur lebih kecil.

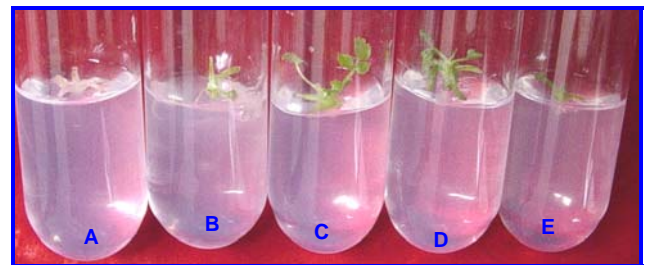
Pada masa simpan 7 bulan, interaksi antara kondisi inkubasi dengan manitol juga tidak nyata, namun perlakuan manitol berpengaruh nyata terhadap jumlah total daun dengan tren linier di mana semakin tinggi taraf manitol maka semakin tinggi pula jumlah total daun walaupun jumlah daun yang terbentuk sangat sedikit, yaitu kurang dari 3 daun per eksplan (Gambar 1 dan 2). Diduga bahwa peningkatan taraf manitol akan mampu memacu pertumbuhan kultur, namun penggunaan manitol pada taraf yang lebih tinggi tidak disarankan karena bahan tersebut mahal harganya sehingga upaya penyimpanan menjadi tidak efisien.

Pada masa simpan 7 bulan, sekitar 50% kultur mengalami kematian sehingga penyimpanan tidak dapat diperpanjang dan perlu dipulihkan atau diregenerasikan kembali. Hal serupa juga terjadi pada kultur kentang hitam yang tidak mampu disimpan lama dalam media yang mengandung manitol 4-8% (Roostika et al. 2005).

Selain manitol, sukrosa juga merupakan sumber karbon dan regulator osmotik. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa secara visual, pertumbuhan kultur



Gambar 1. Pengaruh beberapa taraf manitol terhadap jumlah total daun kultur purwoceng, 7 bulan periode simpan.

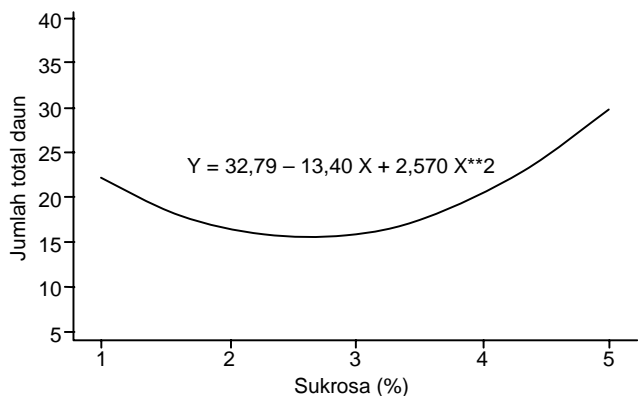


Gambar 2. Penampilan kultur purwoceng (umur 7 bulan) yang disimpan pada beberapa taraf manitol. 1% (A), 2% (B), 3% (C), 4% (D), dan 5% (E).

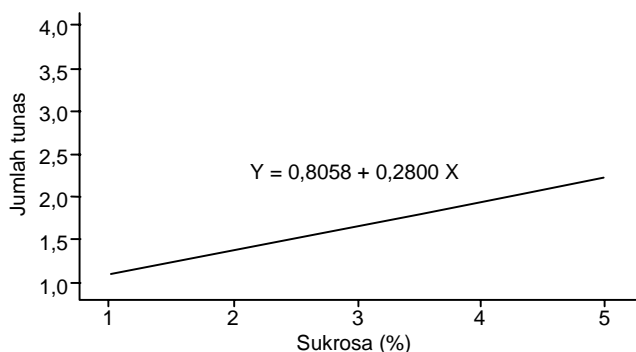
purwoceng yang berasal dari perlakuan sukrosa tampak lebih baik jika dibandingkan dengan yang berasal dari perlakuan manitol. Taraf sukrosa tampak berpengaruh terhadap pertumbuhan kultur. Menurut Da Silva (2004), sukrosa merupakan salah satu jenis gula yang siap dimetabolismekan selain glukosa dan fuktosa. Jenis gula demikian akan lebih mudah diuraikan dalam sel tanaman sehingga sangat mendukung pertumbuhan kultur.

Pada 4 bulan periode simpan, tidak terdapat interaksi yang nyata antara kondisi inkubasi dengan taraf sukrosa terhadap peubah jumlah total daun dan rasio daun segar, namun terdapat interaksi yang nyata antara kedua faktor tersebut terhadap faktor peubah jumlah tunas. Pada masa simpan 7 bulan, tidak terdapat interaksi yang nyata antara kondisi inkubasi dengan sukrosa terhadap semua peubah, namun taraf sukrosa berpengaruh nyata. Taraf sukrosa berpengaruh nyata terhadap jumlah total daun (Gambar 3), dan jumlah tunas (Gambar 4). Taraf sukrosa 2,5% merupakan perlakuan terbaik karena paling menghambat pertumbuhan kultur purwoceng (Gambar 3).

Secara visual, sebagian besar kultur yang berasal dari perlakuan sukrosa 1% terutama yang diinkubasikan dalam *growth chamber* mengalami klorosis (hijau daun memudar) sedangkan kultur yang berasal dari



Gambar 3. Pengaruh beberapa taraf sukrosa terhadap jumlah total daun kultur purwoceng, 7 bulan periode simpan.

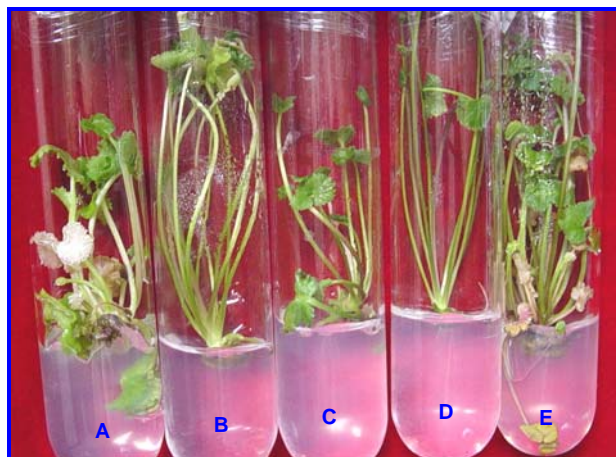


Gambar 4. Pengaruh beberapa taraf sukrosa terhadap jumlah tunas yang terbentuk dari kultur purwoceng, 7 bulan periode simpan.

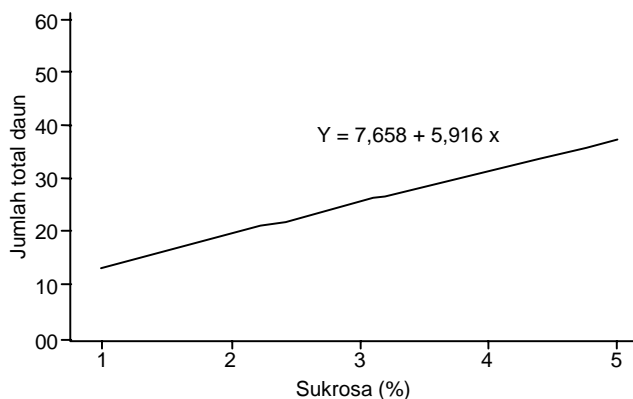
perlakuan sukrosa 5% mempunyai pertumbuhan yang lebih pesat melalui proliferasi tunas adventif, walaupun akhirnya banyak daun yang mengalami kelayuan (Gambar 5). Kelayuan tersebut diduga sebagai akibat dari terbatasnya suplai nutrisi karena terjadinya kompetisi dalam penyerapan hara oleh tunas-tunas yang bermunculan. Kelayuan tersebut mengindikasikan kultur tidak dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama.

Pada masa simpan 10 bulan, taraf sukrosa tampak berpengaruh nyata terhadap jumlah total daun (Gambar 6). Namun pada umur simpan tersebut, sekitar 50% kultur mengalami kematian sehingga penyimpanan dihentikan dan pemulihan perlu dilakukan dengan cara memindahkan kultur ke media regenerasinya untuk diketahui cepat lambatnya proses pemulihan tersebut.

Pada tahap pemulihan, kultur yang berasal dari perlakuan manitol membutuhkan waktu yang lebih lama untuk tumbuh normal kembali sesuai dengan tanaman kontrolnya. Persentase kultur yang bertahan hidup bervariasi tergantung konsentrasi manitol yang digunakan. Persentase kultur yang bertahan hidup pa-



Gambar 5. Penampilan kultur purwoceng (umur 7 bulan) yang disimpan dalam media dengan beberapa taraf sukrosa: 1% (A), 2% (B), 3% (C), 4% (D), dan 5% (E).



Gambar 6. Pengaruh beberapa taraf sukrosa terhadap jumlah total daun kultur purwoceng, 10 bulan periode simpan.

da tahap pemulihan dari perlakuan manitol adalah 16,7% dari perlakuan manitol 1%, 83,3% masing-masing dari perlakuan manitol 2, 3, dan 4%, serta 50% dari perlakuan manitol 5%. Pada awal pertumbuhan, daun yang terbentuk masih berukuran kecil, namun selanjutnya (sekitar 1 bulan) daun yang terbentuk kembali normal. Untuk perlakuan sukrosa, seluruh kultur tidak menampakkan perbedaan morfologi sekalipun pada tahap penyimpanan sehingga pada tahap pemulihan, seluruh kultur tumbuh normal.

Berdasarkan hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa kondisi inkubasi (penurunan suhu hingga 10°C dan fotoperiodisitas hingga 12 jam) tidak berpengaruh nyata terhadap penghambatan pertumbuhan kultur purwoceng. Selain itu, penggunaan sukrosa lebih sesuai daripada manitol. Sukrosa pada taraf suboptimal (2,5%) mampu memperpanjang masa simpan kultur purwoceng (hingga 10 bulan) dibandingkan dengan penggunaan retardan (Rahayu dan Sunarlim 2002, Roostika *et al.* 2007) yang hanya mampu menyimpan

kultur purwoceng selama 4 bulan. Kultur yang disimpan dengan sukrosa (1-5%) mampu bertahan hidup hingga 10 bulan sedangkan kultur yang disimpan dengan manitol (1-5%) hanya mampu disimpan hingga 7 bulan. Selain itu, proses pemulihan kultur yang berasal dari perlakuan sukrosa berjalan secara spontan sehingga lebih singkat dibandingkan dengan yang berasal dari perlakuan manitol.

KESIMPULAN

Penurunan suhu dan fotoperiodisitas tidak mampu memperpanjang masa simpan, sebaliknya penggunaan regulator osmotik mampu memperpanjang masa simpan kultur purwoceng. Sukrosa 2,5% mampu memperpanjang masa simpan hingga 10 bulan tanpa perubahan morfologi sehingga proses pemulihannya berjalan secara spontan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bessembinder, J.J.E., G. Staritsky, and E.A. Zandvoort. 1993.** Longterm *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 33:121-127.
- Da Silva, J.A.T. 2004.** The effect of carbon source on *in vitro* organogenesis *Chrysanthemum* thin cell layers. *Bragantia, Campinas* 63(2):165-177.
- Hu, C.Y. and P.J. Wang. 1983.** Meristem, shoot tip, and bud culture. In Evans, D.A., W.R. Sharp, P.V. Amiroto, and Y. Yamada (Eds.). *Handbook of Plant Cell Culture Vol. I. Techniques for Propagation and Breeding.* McMillan Publishing, New York. p. 177-227.
- Jarret, R.L. and N. Gawel. 1991.** Chemical and environmental growth regulation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 25(2):152-159.
- Keller, E.R.J., A. Senula, S. Leunufna, and M. Grube. 2006.** Slow growth storage and cryopreservation-tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *Int. J. Refrigeration* 29:411-417.
- Mariska, I., Suwarno, dan D.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. Bogor, 18 Desember 1996. Balitbio, Bogor.
- Minitab. 2004.** Minitab Release 14 for Windows. Minitab Corporation.
- Rahayu, S. dan N. Sunarlim. 2002.** Koservasi tanaman obat langka purwoceng dengan pertumbuhan minimal. *Bul. Plasma Nutfah* 8(1):29-33.
- Rifai, M.A., Rugayah, dan E.A. Widjaja. 1992.** Tiga Puluh Tumbuhan Obat Langka Indonesia. Penggalang Taksonomi Tumbuhan Indonesia. Floribunda. Bogor. 28 him.
- Roostika, I., N. Sunarlim, dan A.V. Novianti. 2005.** Teknik penyimpanan kentang hitam secara kultur *in vitro*. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 24(1):46-52.
- Roostika, I., R. Purnamaningsih, dan I. Darwati. 2007.** Penyimpanan *in vitro* tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molk.) melalui aplikasi pengenceran media dan paclobutrazol. *J Penelitian Tanaman Industri (Submit)*.
- Sarkar, D. and P.S. Naik. 1998.** Factors affecting minimal growth conservation of potato microplants *in vitro*. *Euphytica* 102(2):275-280.
- Sunarlim, N., Minantyorini, dan W.H. Adil. 1999.** Penyimpanan ubi jalar secara *in vitro* dengan pertumbuhan minimal. *Bul. Plasma Nutfah* 5(1):1-5.
- Withers, L.A. 1985.** Cryopreservation and storage of germplasm. In Dixon, D.A. (Ed.). *Plant Cell Culture.* IRL Press, Washington. p. 169-190.
-