

Pemanfaatan Teknik Kultur *In Vitro* untuk Konservasi Plasma Nutfah Ubi-ubian

Nurwita Dewi*, Iswari S. Dewi, dan Ika Roostika

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: nurwitadewi@gmail.com

Diajukan: 18 September 2013; Diterima: 10 Januari 2014

ABSTRACT

Utilization of *In Vitro* Culture Technique for Tuber Crops Conservation. Nurwita Dewi, Iswari S. Dewi, and Ika Roostika. Except for potato, sweet potato, taro, yam, and cassava, most of tuber crops are considered as underutilized crops. However, tuber crops are potential as alternative carbohydrate sources, so they can be used as food reserves to face global climate change that affects food security in certain area throughout the world, including Indonesia. Having high diversity in tuber crops germplasm, Indonesia must be able to conserve those germplasm to ensure their availability in the future. In the future, without ignoring all the probable constraints, the prospect in utilization of *in vitro* culture technique will be higher for improvement of conservation and management of genetic resources in the form of active and base collections. In this paper, strategy in developing *in vitro* collection of tuber crops germplasm, i.e. slow growth technique for medium term storage and cryopreservation technique for long term storage, is discussed including how to analyze genetic stability of the collections. Several national and international research centers dealing with research and development of *in vitro* conservation technique are presented.

Keywords: *In vitro* culture, conservation, tuber crops.

ABSTRAK

Pemanfaatan Teknik Kultur *In Vitro* untuk Konservasi Plasma Nutfah Ubi-ubian. Nurwita Dewi, Iswari S. Dewi, dan Ika Roostika. Selain kentang, ubi jalar dan ubi kayu, umumnya tanaman ubi-ubian masih kurang pemanfaatannya. Tanaman ubi-ubian berpotensi sebagai sumber karbohidrat alternatif sehingga dapat menjadi cadangan pangan dalam menghadapi perubahan iklim global yang saat ini mempengaruhi ketahanan pangan di beberapa daerah tertentu di dunia, termasuk di Indonesia. Indonesia yang memiliki diversitas yang tinggi untuk plasma nutfah ubi-ubian harus dapat mempertahankan ketersediaannya di masa depan. Tanpa mengesampingkan kendala yang akan timbul, peluang pemanfaatan teknik kultur *in vitro* sangat besar dalam perbaikan cara konservasi dan pengelolaan sumber daya genetik tanaman ubi-ubian di Indonesia, baik dalam bentuk koleksi aktif maupun koleksi dasar. Dalam tinjauan ini, dipaparkan pemanfaatan strategi penyimpanan plasma nutfah ubi-ubian *in vitro* melalui teknik pertumbuhan lambat

untuk konservasi jangka menengah dan penghentian pertumbuhan melalui kriopreservasi untuk penyimpanan jangka panjang, termasuk cara menganalisis kestabilan genetik koleksi. Di samping itu, dikemukakan juga beberapa institusi nasional dan internasional yang melakukan penelitian dan pengembangan teknik konservasi *in vitro*.

Kata kunci: Kultur *in vitro*, konservasi, ubi-ubian.

PENDAHULUAN

Indonesia yang telah diakui sebagai salah satu pusat keanekaragaman hayati terbesar (*mega biodiversity*) di dunia memiliki banyak plasma nutfah tanaman pangan, di antaranya plasma nutfah ubi-ubian. Menurut Flach dan Rumawas (1996), Indonesia memiliki beberapa plasma nutfah ubi-ubian sampai ke tingkat spesies, seperti pada *Dioscorea*, yaitu *D. alata* (ubi kelapa), *D. hispida* (gadung), dan *D. esculenta*, *D. acuelata*, dan *D. bulbifera*, serta pada *Amorphophallus*, yaitu *A. campanulatus* (suweg), *A. mulleri* atau *A. oncophyllus* (iles-iles).

Di Indonesia, ubi jalar (*Ipomoea batatas*) dan ubi kayu (*Manihot esculenta*) sudah lama digunakan sebagai tanaman pangan penghasil karbohidrat di samping sereal yang menjadi tanaman pangan utama. Selain kedua ubi-ubian tersebut, beberapa jenis ubi-ubian, seperti garut (*Marantha arundina*), ganyong (*Canna edulis*), kentang hitam (*Coleus tuberosus*), talas (*Colocasia esculenta*), belitong (*Xanthosomas agittifolium*), dan *Dioscorea* spp. sangat potensial sebagai bahan pangan alternatif, terutama untuk menghadapi rawan pangan akibat peningkatan jumlah penduduk dan perubahan iklim global yang mempengaruhi proses produksi pangan. Beberapa jenis ubi-ubian, seperti kentang hitam dan *Dioscorea*, ternyata selain sebagai penghasil karbohidrat juga mempunyai properti yang dapat dimanfaatkan untuk berbagai keperluan industri dan obat-obatan (Harijono *et al.*, 2013; Nugraheni *et al.*, 2011). Namun demikian, sampai saat ini tingkat konsumsi dan pemanfaatan ubi-ubian, terutama ubi-ubian minor, masih rendah dan keberadaannya juga kurang mendapat perhatian.

Untuk menjamin ketersediaannya di masa depan, usaha konservasi perlu dilakukan karena plasma nutfah ubi-ubian tersebut dikhawatirkan menjadi punah, baik akibat dinamika alam maupun ulah manusia, seperti deforestasi, terjadinya pengembangan secara berlebihan terhadap suatu kultivar yang dianggap menguntungkan secara ekonomi, dan juga meningkatnya alih fungsi lahan seiring dengan meningkatnya pembangunan infrastruktur (Towill, 2005). Biji merupakan material yang umum digunakan untuk konservasi. Namun demikian, tidak semua aksesi plasma nutfah tanaman ubi-ubian dapat berbunga dan menghasilkan biji. Walaupun ada yang menghasilkan biji, biji ubi-ubian tidak dapat disimpan dalam kondisi kelembaban dan suhu rendah dalam jangka waktu yang lama (*recalcitrant*). Oleh sebab itu, umumnya konservasi plasma nutfah ubi-ubian dilakukan dalam keadaan tanaman tumbuh optimal secara *ex situ* di lapang atau *field gene bank* (Gonzales-Benito *et al.*, 2004). Namun, terdapat kelemahan konservasi *ex situ* di lapang, yaitu terjadinya kehilangan plasma nutfah akibat serangan organisme pengganggu tanaman (OPT), seperti hama dan penyakit, selain cekaman lingkungan abiotik (Towill, 2005). Untuk mengatasi masalah tersebut, pengembangan koleksi plasma nutfah secara *in vitro* merupakan strategi alternatif sebagai cadangan plasma nutfah yang dikonservasi di lapang. Teknologi *in vitro* saat ini sudah menjadi kebutuhan dalam strategi pemeliharaan diversitas tanaman dalam bentuk koleksi aktif (*active collections*) dan koleksi dasar (*base collections*), terutama untuk spesies yang perbanyakannya dilakukan secara vegetatif, seperti tanaman ubi-ubian (Keller *et al.*, 2006). Beberapa strategi yang dapat digunakan dalam konservasi plasma nutfah tanaman secara *in vitro*, antara lain penyimpanan dalam keadaan (a) kultur tumbuh normal untuk penyimpanan jangka pendek, (b) kultur tumbuh dengan penampilan minimal (*growth reduction or miniaturization*) karena kultur tumbuh sangat lambat untuk penyimpanan jangka menengah, dan (c) kultur sama sekali tidak tumbuh (*suspend or stop the growth*) karena kultur disimpan pada suhu sangat rendah (-196°C) untuk penyimpanan jangka panjang (Dube *et al.*, 2011).

Tinjauan ini akan memaparkan strategi, peluang, dan kendala penyimpanan melalui teknik kultur *in vitro*, yaitu metode pertumbuhan lambat (*minimal or slow growth*) dan penghentian pertumbuhan (*cryopreservation*), yang telah dikembangkan untuk menyimpan plasma nutfah ubi-ubian, serta teknik biologi molekuler yang dapat diaplikasikan untuk pengujian stabilitas genetik pada plasma nutfah tersebut setelah penyimpanan. Di samping itu, tinjauan

ini juga memberikan informasi tentang berbagai lembaga penelitian internasional yang melakukan penelitian dan pengembangan teknik konservasi plasma nutfah ubi-ubian *in vitro*.

STRATEGI METODE PERTUMBUHAN LAMBAT

Penyimpanan tanaman secara *in vitro* untuk koleksi aktif umumnya dilakukan dalam keadaan tanaman tumbuh normal dengan menggunakan formula media untuk perbanyakan. Tanaman yang disimpan di media tersebut biasanya hanya dapat bertahan 2–3 bulan akibat kehabisan nutrisi dan diperlukan subkultur kembali ke media baru (Ramkhrisna *et al.*, 2005). Siklus subkultur akan berpengaruh terhadap lama penyimpanan dan biaya pemeliharaan yang diperlukan dalam konservasi plasma nutfah *in vitro*. Sebaliknya, pada penyimpanan dengan metode pertumbuhan lambat melalui induksi penghambatan laju pertumbuhan, tanaman tumbuh minimal sehingga frekuensi subkultur berkurang dan intervalnya meningkat. Hal ini tentu akan menghindarkan risiko terhadap hilangnya koleksi sebagai akibat dari penurunan vigor, kontaminasi atau terjadi kesalahan pelabelan. Pada dasarnya strategi penyimpanan *in vitro* ditujukan agar kapan saja diperlukan, tanaman segera dapat diperbanyak dan didistribusikan (Towill, 2005).

Laju metabolisme tanaman *in vitro* dapat dihambat dengan dua cara, yaitu (1) memodifikasi komponen media, melalui penggunaan regulator osmotik (*osmoregulator*) dan zat penghambat tumbuh (*retardant*), penurunan konsentrasi garam-garam makro, peningkatan atau penurunan konsentrasi sukrosa, serta (2) memodifikasi lingkungan tumbuh, dengan penyimpanan pada suhu rendah dan pengurangan intensitas cahaya. Kombinasi dari kedua cara tersebut dapat pula dilakukan (Keller *et al.*, 2006).

Modifikasi Komponen Media

Penggunaan regulator osmotik

Regulator osmotik (*osmoregulator*) adalah suatu senyawa organik yang dapat mempengaruhi tekanan osmotik dalam media kultur sehingga mengurangi serapan hara mineral dan air oleh sel atau jaringan yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan kultur (Dodds dan Roberts, 1985). Sukrosa, manitol, dan sorbitol yang merupakan produk fotosintesis utama banyak digunakan dan dilaporkan dapat memperpanjang masa simpan *in vitro* karena dapat berfungsi sebagai *osmoregulator* (Chaorensu dan Phansiri, 2004; Dewi, 2002; Hassan *et al.*, 2007; Shawky dan Aly, 2007).

Sukrosa sebenarnya merupakan sumber energi dan sumber karbon utama dalam kultur *in vitro* dan sangat berperan dalam siklus sel (Tyas *et al.*, 2013), serta pembelahan dan pembentukan sel (Dewitte dan Murray, 2003). Pertumbuhan tanaman dalam kultur *in vitro* sangat tergantung pada konsentrasi sukrosa yang diberikan. Konsentrasi sukrosa dalam media dasar untuk mendapatkan pertumbuhan normal adalah 30 g/l (Murashige dan Skoog, 1962), sedangkan dalam konsentrasi yang sangat tinggi (90 g/l) sukrosa dapat berfungsi sebagai *osmoregulator* yang menghambat pertumbuhan tanaman (Pookmanee *et al.*, 2001).

Dalam hubungannya sebagai sumber energi, penurunan konsentrasi sukrosa (<30 g/l) dalam media kultur akan menyebabkan tanaman memperlambat siklus selnya sehingga pembelahan dan pembentukan sel yang berjalan lambat menyebabkan pertumbuhan terhambat. Hal ini ditunjukkan oleh Hassan *et al.* (2007) pada tanaman bawang putih, yaitu pada media yang diberi 0,1 M dan 0,2 M sukrosa dan *Dioscorea* spp. (Maurie *et al.*, 1993) yang terhambat pertumbuhan akar dan tunasnya. Dari hasil penelitian Tyas *et al.* (2012) diketahui bahwa jeruk besar hanya dapat disimpan minimal tujuh bulan pada media MS dengan sukrosa 1–2%. Dalam kondisi ekstrim, yaitu media tanpa diberi sukrosa, pertumbuhan tanaman sangat terhambat, misalnya pada kultur kentang hitam (Roostika *et al.*, 2005). Kultur ubi jalar dalam media tanpa sukrosa, setelah disimpan delapan bulan, bahkan tidak dapat bertahan hidup dan mati (Roostika dan Sunarlim, 2001).

Manitol dan sorbitol merupakan gula alkohol polihidrik yang pada beberapa tanaman berperan penting dalam translokasi asimilat di dalam floem (Deguchi *et al.*, 2004). Penambahan manitol atau sorbitol pada konsentrasi tertentu ke dalam media kultur dapat menghambat pertumbuhan ubi-ubian (Acedo, 1995; Bessembinder *et al.*, 1993; Borges *et al.*, 2004; Dewi, 2002; Sunarlim *et al.*, 2004; Unnikrishnan *et al.*, 1992; Xin, 1988; Zandvoort *et al.*, 1994). Hal ini disebabkan terjadinya peningkatan tekanan osmotik media sehingga aliran nutrisi ke dalam jaringan tanaman terhambat. Manitol dan sorbitol, seperti halnya gula, juga dapat dimetabolismekan sebagai sumber energi oleh tanaman sesudah beberapa bulan dalam penyimpanan sehingga mengurangi efektivitas waktu simpan karena pertumbuhan yang meningkat.

Di *International Potato Center* (CIP), protokol penyimpanan ubi-ubian, khususnya ubi jalar, digunakan sorbitol 3–4% (Panta *et al.*, 2009). Pada umumnya, beberapa peneliti menyatakan bahwa manitol tidak cocok untuk penyimpanan plasma nutfah ubi-ubian (Engelmann, 1991; Roostika *et al.*, 2005; Sunarlim *et*

al., 1999). Dengan penggunaan manitol 4%, beberapa aksesori ubi jalar menurun ketegarannya (Sunarlim *et al.*, 1999) atau membentuk kalus (Golmirzaie dan Toledo, 1999). Oleh karena itu, pemberian manitol umumnya dikombinasikan dengan pemberian sukrosa. Pada vanila, penambahan manitol (10–15 g/l) yang seimbang dengan pemberian sukrosa pada konsentrasi rendah (15–10 g/l) dapat menginduksi pertumbuhan lambat dan 80–90% kultur dapat disimpan sampai 360 hari (1 tahun) dengan syarat penyimpanan dalam wadah yang tertutup rapat dengan *aluminium foil*. Dengan disimpan berkali-kali pada media yang sama, baru setelah 7 tahun, planlet vanila pada media tersebut mulai menunjukkan penurunan laju pertumbuhan dan akhirnya mati (Divakaran *et al.*, 2006).

Penggunaan zat penghambat tumbuh

Zat penghambat tumbuh yang dapat digunakan untuk konservasi *in vitro* antara lain *paclobutrazol* (PBZ), *cycocel* (*chlormequat chloride/chlorocholine chloride*/CCC), *ancymidol*, dan asam absisat (ABA). PBZ merupakan senyawa organik sintetik yang menghambat urutan reaksi oksidasi dari ent-kaurene menjadi asam ent-kaurenoid dalam pembentukan asam giberelin (GA) dan sering ditambahkan ke dalam media kultur untuk memperpanjang masa simpan. Ketika pembentukan GA terhambat, walaupun pembelahan sel masih terjadi, sel tidak memanjang sehingga menyebabkan buku dan tunas menjadi pendek (Arteca, 1996). PBZ juga berperan dalam menginduksi modifikasi morfologi, seperti pori stomata daun menjadi lebih kecil dan daun lebih tebal (Keatmetha *et al.*, 2006), meningkatkan biosintesis klorofil dalam jaringan tanaman (Pinchera dan Fletchev, 1994) sehingga batang menjadi lebih tegar dan daun menjadi lebih hijau, menghambat pemanjangan sel pada meristem subapikal, memperpendek ruas tanaman, dan mempertebal batang (Cathey, 1975). PBZ dapat memperbaiki penampilan tanaman yang disimpan dan memperpanjang masa simpan pada penyimpanan beberapa aksesori ubi jalar (Roostika dan Sunarlim, 2001).

Ancymidol sering digunakan sebagai pengganti manitol dalam konservasi tanaman *in vitro* karena pada konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan dengan menghalangi tahap pembentukan ent-kaurene menjadi ent-kaurenol dan oksidasi ent-kaurenol menjadi asam ent-kaurenoid pada lintasan biosintesis GA (Sarkar *et al.*, 2001). Di samping itu, *ancymidol* juga dapat menghambat sintesis selulosa sehingga menghambat sintesis dan pemanjangan dinding sel (Hofmannová *et al.*, 2008). Penggunaan *ancymidol* hingga 5 ppm dapat menghambat pertumbuhan ubi jalar hingga masa simpan 8 bulan. Untuk

memperpanjang masa simpan, peningkatan konsentrasi diduga dapat dilakukan karena *ancymidol* tidak menimbulkan toksisitas, namun hal ini tidak disarankan karena harga *ancymidol* relatif mahal (Roostika dan Sunarlim, 2001).

Cyocel dapat menghambat pertumbuhan tanaman. Penggunaannya hingga konsentrasi 500 mg/l dapat menghambat pertumbuhan ubi jalar, namun konsentrasi yang lebih tinggi dapat bersifat toksik bagi tanaman (Golmirzaie dan Toledo, 1999). ABA merupakan hormon pertumbuhan yang berperan sebagai inhibitor sehingga dapat menghambat pembelahan dan pemanjangan sel. Penambahan ABA 5–20 mg/l ke dalam media dapat menghambat pertumbuhan ubi jalar (Golmirzaie dan Toledo, 1999) dan *Dioscorea* (IITA, 2012), namun penggunaan ABA, seperti juga *Cyocel*, dalam konservasi *in vitro* jarang dilakukan.

Pengenceran garam-garam mineral

Pertumbuhan lambat dapat dilakukan dengan menggunakan media dasar yang diencerkan antara setengah dan seperempat bagian dari formulasi dasar. Pengenceran media menjadi setengah atau seperempat bagiannya menyebabkan berkurangnya unsur makro, terutama NH_4^+ dan NO_3^- , sehingga nitrogen (N) sebagai unsur yang penting untuk pertumbuhan menjadi berkurang dan berakibat pertumbuhan biakan terhambat. Penggunaan $\frac{1}{4}$ MS pada *Amorphophallus onchophyllus* dapat memperpanjang masa simpan (Pookmanee *et al.*, 2001), namun penggunaan $\frac{1}{2}$ MS dan $\frac{1}{4}$ MS pada ubi jalar menyebabkan pengkalusan pada batang. Keadaan ini sesuai dengan pendapat George dan Sherington (1984) yang menyatakan bahwa media dengan konsentrasi hara makro sangat rendah akan mendorong pertumbuhan kalus dan akar. Kondisi ini tidak direkomendasikan untuk konservasi *in vitro* karena pembentukan kalus cenderung menyebabkan variasi somaklonal.

Modifikasi Lingkungan Fisik

Suhu rendah

Menurunkan suhu lingkungan tumbuh hingga mendekati 0°C untuk tanaman subtropis dan beberapa derajat di bawah normal untuk tanaman tropis dapat mengurangi kecepatan pertumbuhan pada banyak tanaman (Dodds dan Roberts, 1985; George dan Sherington, 1984). Hal ini disebabkan suhu rendah menginduksi akumulasi lemak tidak jenuh pada membran sel sehingga membran sel menjadi tebal dan akibatnya pembelahan dan pemanjangan sel terhambat. Konservasi pada suhu 9°C dalam keadaan gelap (Staritsky *et al.*, 1986) dan suhu 4°C (He dan Li, 1999) pada talas, serta suhu 10°C pada belitung

(*Xanthosoma sagittifolium*) (Acheampeong, 1982 dalam Hensaw, 1987) dapat memperpanjang masa simpan hingga 1–3 tahun. Penurunan suhu juga telah diaplikasikan pada *Dioscorea*, yaitu dengan suhu inkubasi 10–22°C sehingga dapat disimpan selama 1–2 tahun (Ng dan Ng, 1997), sedangkan beberapa aksesi talas dapat disimpan pada suhu 20°C selama 9–12 bulan (Taylor, 1996). Dalam kisaran genotipe yang luas, ubi jalar memerlukan kisaran suhu penyimpanan yang cukup besar, yaitu 18–27°C (Panta *et al.*, 2009). Sebaliknya, beberapa spesies, seperti ubi kayu (Aladele dan Kuta, 2008) dan *Dioscorea* (Mandal dan Chandel, 1996), sangat sensitif terhadap penyimpanan dengan suhu rendah karena dapat menimbulkan fenolisis dan nekrosis (Desamero, 1990 dalam Golmirzaie dan Toledo, 1999). Umumnya, penggunaan suhu rendah untuk penyimpanan *in vitro* dikombinasikan dengan modifikasi media (Pookmanee, 2001; Zandvoort *et al.*, 1994). Secara umum, tanaman tropis biasanya kehilangan viabilitasnya bila disimpan pada suhu rendah (Golmirzaie dan Toledo, 1999).

Pengurangan intensitas cahaya

Selain menggunakan gula yang tersedia dalam media sebagai sumber karbon, biakan juga menggunakan gula dari hasil fotosintesis. Melalui pengurangan intensitas cahaya, masa simpan dapat diperpanjang karena intensitas cahaya rendah dapat menghambat kecepatan tumbuh dengan mengurangi proses fotosintesis dan metabolisme (Huges, 1981 dalam Golmirzaie dan Toledo, 1999).

KRIOPRESERVASI

Teknik kriopreservasi merupakan penyimpanan material tanaman pada suhu sangat rendah dalam nitrogen cair (suhu -196°C). Teknik ini merupakan cara yang ideal untuk menyimpan plasma nutfah dalam jangka panjang karena tidak diperlukan subkultur (Engelmann, 1997; Kartha dan Engelmann, 1994; Reed, 2001). Kestabilan genetik tanaman diasumsikan dapat terjaga pada saat eksplan ditumbuhkan kembali. Keadaan ini dimungkinkan karena pada suhu sangat rendah seluruh proses metabolisme dan pembelahan sel berlangsung sangat lambat atau bahkan terhenti (Kantha dan Engelmann, 1994). Teknik kriopreservasi yang dapat digunakan meliputi teknik klasik yang didasarkan pada teknik pembekuan lambat/bertahap (*slow-freezing/two-step freezing*) dan teknik baru yang didasarkan pada vitrifikasi (Engelmann, 2000).

Teknik klasik didasarkan pada *freeze- induce dehydration*, yaitu dehidrasi yang diinduksi melalui pembekuan pada suhu di bawah titik beku air (hingga

-40°C). Teknik lama sering disebut juga sebagai teknik pembekuan lambat atau teknik pembekuan dua tahap yang meliputi inkubasi sel pada krioprotektan (1–2 µl) yang menyebabkan dehidrasi moderat lalu diikuti dengan pembekuan lambat dengan kecepatan 1°C/menit dan pembekuan dalam nitrogen cair. Eksplan yang cocok digunakan pada kriopreservasi dengan teknik klasik, yaitu yang berasal dari kultur yang tidak terdiferensiasi, seperti suspensi sel dan kalus serta spesies yang toleran terhadap suhu rendah, sedangkan yang tidak cocok digunakan, yaitu tunas apikal, embrio zigotik dan embrio somatik serta spesies tanaman tropis (Engelmann, 1997; Takagi, 2000). Teknik ini telah berhasil digunakan untuk kriopreservasi ubi kayu, namun teknik pembekuan bertahap kurang diaplikasikan secara luas karena memerlukan peralatan pendingin (*freezer*) yang mahal (Danso dan Ford-Llyod, 2011; Escobar *et al.*, 1997). Pada ubi jalar dan gembili, penggunaan teknik klasik menunjukkan kemampuan hidup kultur yang rendah (Benson *et al.*, 2011).

Teknik baru yang berdasarkan vitrifikasi, terdiri atas enkapsulasi dehidrasi, vitrifikasi, enkapsulasi vitrifikasi, desikasi, pratumbuh (*pregrowth*), pratumbuh desikasi, dan *droplet*.

Enkapsulasi-dehidrasi

Teknik ini didasarkan pada penggunaan benih sintetik. Metodenya sederhana, namun memerlukan benih sintetik yang cukup banyak dan hanya dapat digunakan pada tanaman yang toleran terhadap konsentrasi sukrosa tinggi. Teknik ini telah dikembangkan pada ubi kayu (Sakai, 2004).

Vitrifikasi

Teknik ini didasarkan pada proses vitrifikasi, yaitu proses pembentukan struktur berupa kaca (*meta-stable glass*) pada suhu yang sama dengan atau di bawah titik beku larutan tertentu. Metodenya lebih sederhana daripada enkapsulasi-dehidrasi, banyak digunakan untuk tanaman yang peka terhadap perlakuan suhu rendah (Takagi *et al.*, 1997). Teknik vitrifikasi telah digunakan secara luas pada banyak tanaman (Sakai dan Engelmann, 2007), di antaranya ubi kayu, ubi jalar, dan *Dioscorea* spp. Faktor pembatas teknik ini, yaitu diperlukannya toleransi yang cukup tinggi dari bahan tanaman terhadap larutan vitrifikasi (Sakai dan Engelmann, 2007).

Enkapsulasi-vitrifikasi

Teknik ini merupakan kombinasi antara teknik enkapsulasi-dehidrasi dan vitrifikasi. Pada teknik ini, bahan tanaman dienkapsulasi dalam kapsul alginat,

kemudian dilakukan dehidrasi jaringan dengan menggunakan larutan krioprotektan, selanjutnya dilakukan pembekuan jaringan. Teknik ini dapat digunakan pada tanaman yang peka terhadap perlakuan desikasi dan telah digunakan pada banyak tanaman, seperti *Dioscorea* spp., ubi jalar, dan ubi kayu (Sakai dan Engelmann, 2007; Sakai *et al.*, 2008).

Desikasi

Desikasi merupakan teknik yang paling sederhana, yaitu tanaman yang telah didesikasi, kemudian secara cepat direndam ke dalam nitrogen cair. Teknik ini sangat sesuai untuk tanaman yang toleran terhadap desikasi. Teknik ini tidak dikembangkan untuk penyimpanan ubi-ubian.

Pratumbuh (*pregrowth*)

Pratumbuh merupakan teknik dengan bahan tanaman yang diperlakukan dengan krioprotektan, kemudian secara cepat direndam ke dalam nitrogen cair. Teknik ini relatif sederhana dan murah, tetapi kesulitannya terjadi dalam memanipulasi jaringan embriogenik tanpa enkapsulasi. Teknik ini tidak dikembangkan untuk penyimpanan ubi-ubian.

Pratumbuh-desikasi

Pratumbuh-desikasi adalah teknik kriopreservasi dengan bahan tanaman yang diperlakukan dengan krioprotektan, kemudian secara cepat dimasukkan ke nitrogen cair. Teknik ini telah digunakan pada embrio zigotik kelapa dan kelapa sawit (Engelmann, 2000), namun belum ditemukan laporan pada ubi-ubian.

Droplet-vitrifikasi

Droplet-vitrifikasi adalah teknik kriopreservasi dengan materi tanaman yang diperlakukan dengan larutan krioprotektan, kemudian diletakkan di atas *aluminium foil* dan ditetesi larutan krioprotektan, kemudian secara cepat dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Teknik ini secara rutin telah diterapkan untuk konservasi jangka panjang pada kentang dan pisang (Panis *et al.*, 2005), juga telah berhasil digunakan pada berbagai jenis tanaman, seperti bawang putih, pepaya, dan ubi-ubian seperti talas, *Dioscorea* spp., dan ubi jalar (Leunufna, 2007; Sakai dan Engelmann, 2007).

Penelitian kriopreservasi telah banyak dilakukan pada beberapa jenis plasma nutfah ubi-ubian (Tabel 1). Protokol kriopreservasi untuk ubi kayu telah diperoleh dengan menggunakan metode klasik (Escobar *et al.*, 1997) dan enkapsulasi-dehidrasi (Escobar *et al.*, 2000), serta untuk ubi jalar dan pisang dengan droplet-vitrifikasi (Panis *et al.*, 2005).

Tabel 1. Hasil penelitian kriopreservasi pada berbagai jenis ubi-ubian.

Komoditas	Jenis eksplan	Teknik kriopreservasi	Pustaka
Ubi kayu	Tunas pucuk	Vitrifikasi	Charoensub <i>et al.</i> (2000); Ng dan Ng (2000)
Ubi kayu	Tunas pucuk	Enkapsulasi-dehidrasi	Escobar <i>et al.</i> (2000)
Ubi jalar	Tunas pucuk	Vitrifikasi	Towill dan Jarret (1992)
Ubi jalar	Tunas pucuk	Enkapsulasi-vitrifikasi	Hirai dan Sakai (2003)
<i>Amorphopallus</i> sp.	Tunas pucuk	Vitrifikasi	Zhang <i>et al.</i> (2001)
<i>Dioscorea alata</i>	Tunas pucuk	Vitrifikasi	Ng dan Ng (2000)
<i>Dioscorea</i> spp.	Tunas pucuk	Enkapsulasi-dehidrasi	Malaurie <i>et al.</i> (1998); Mandal <i>et al.</i> (1996)
<i>Dioscorea</i> spp.	Tunas pucuk	Vitrifikasi	Kyesmu dan Takagi (2000); Mandal (2000)
Talas	Tunas pucuk	Enkapsulasi-dehidrasi	Taylor (1996)
Talas	Tunas pucuk	Droplet-vitrifikasi	Sant <i>et al.</i> (2008a)
Talas	Tunas pucuk	Vitrifikasi	Sant <i>et al.</i> (2008b); Takagi <i>et al.</i> (1997)

Aplikasi teknik kriopreservasi secara rutin pada tanaman ubi-ubian masih terbatas pada lembaga-lembaga penelitian tertentu, seperti CIP untuk konservasi plasma nutfah ubi jalar (Lizzaraga *et al.*, 1992; Tay, 2000) dan ganyong (Panta, 2009), *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA) untuk *Dioscorea* spp. dan ubi kayu, *International Center for Tropical Agriculture* (CIAT) untuk ubi kayu (Ashmore, 1997), dan *Centre for Pacific Crops and Trees-Secretariat of the Pacific Community* (CePaCT-SPC) untuk talas. Di Indonesia, beberapa penelitian teknik kriopreservasi telah dilakukan, antara lain di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) pada tanaman ubi kayu dan ubi jalar (Roostika *et al.*, 2004a; 2004b) dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) pada tanaman ubi kayu (Sudarmonowati, 2000).

PENGUJIAN STABILITAS GENETIK PADA PLASMA NUTFAH PASCAKONSERVASI

Tujuan konservasi adalah melestarikan plasma nutfah yang dimiliki agar dapat dimanfaatkan untuk masa kini dan mendatang. Dalam kegiatan tersebut, pemeliharaan stabilitas genetik merupakan hal yang sangat penting diperhatikan untuk menjamin plasma nutfah yang disimpan tetap sesuai dengan identitas asalnya. Dalam kegiatan konservasi *in vitro*, untuk menghindari ketidakstabilan genetik, biasanya digunakan bahan tanaman yang telah mengalami diferensiasi, seperti kultur embrio, tunas, dan planlet (Withers, 1991) karena jenis eksplan yang digunakan relatif stabil terhadap variasi somaklonal. Berbagai metode dapat digunakan untuk mengevaluasi kestabilan genetik dan kerusakan yang mungkin terjadi akibat konservasi *in vitro* (Benson *et al.*, 2011), di antaranya analisis morfologi, histologi, sitologi, biokimia, dan molekuler.

Analisis morfologi

Analisis morfologi di lapang dapat dilakukan dengan menggunakan deskriptor tanaman yang diamati. Analisis dilakukan dengan membandingkan penampilan fenotipik tanaman hasil konservasi *in vitro* dengan tanaman asalnya. Untuk menjamin kepastian kestabilan genetik, analisis (karakterisasi) morfologi perlu dikombinasikan dengan analisis molekuler karena hasil analisis morfologi sangat dipengaruhi oleh lingkungan. Analisis morfologi dilakukan secara rutin terhadap koleksi kultur *in vitro* ubi kayu di CIAT dan ubi jalar di CIP.

Analisis histologi dan sitologi

Analisis histologi dan sitologi dapat dilakukan dengan mengamati integritas jaringan, analisis kromosom, dan tingkat ploidi. Analisis tersebut telah dilakukan pada kentang yang disimpan secara enkapsulasi-dehidrasi (Benson *et al.*, 1996). Hasilnya menunjukkan bahwa tanaman kentang hasil kriopreservasi bersifat stabil dan tidak berbeda dengan tanaman kontrolnya.

Analisis biokimia

Analisis biokimia dapat dilakukan melalui analisis isoenzim. Isoenzim dapat digunakan untuk mengarakterisasi plasma nutfah karena analisis tersebut relatif lebih stabil terhadap lingkungan daripada analisis morfologi dan umumnya bersifat polimorfik, namun penggunaannya terbatas karena tidak dapat mendeteksi tingkat variasi yang sedikit (Shukla *et al.*, 2004). Di CIAT, analisis isoenzim telah digunakan untuk menganalisis kestabilan genetik ubi kayu hasil penyimpanan *in vitro*.

Analisis molekuler

Analisis molekuler dapat dilakukan antara lain dengan *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Simple Sequence Repeat* (SSR), dan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Analisis molekuler digunakan untuk menganalisis tanaman

sampai pada tingkat DNA terhadap ada tidaknya perubahan genetik pada materi yang dikonservasi. Analisis berbasis DNA ini lebih disukai karena bersifat polimorfis dan tidak dipengaruhi lingkungan (Peredo *et al.*, 2008).

Beberapa contoh aplikasi analisis molekuler pada tanaman hasil konservasi, yaitu analisis RFLP dan RAPD pada ubi kayu yang disimpan dengan pertumbuhan lambat (Angel *et al.*, 1996) dan analisis RAPD untuk *Dioscorea* spp. yang disimpan secara kriopreservasi dengan teknik vitrifikasi dan enkapsulasi-dehidrasi (Mandal *et al.*, 2008). Hasil analisis molekuler menunjukkan adanya kestabilan genetik dari bahan tanaman yang disimpan dengan kedua teknik konservasi tersebut.

Analisis epigenetik

Adanya ketidakstabilan genetik berupa metilasi DNA dilaporkan pada kentang yang dikriopreservasi dengan pembekuan cepat (Harding, 1997) dan pada jeruk yang dikriopreservasi dengan cara vitrifikasi (Hao dan Deng, 2002), serta perubahan kromatin pada mahogany (*Swietenia macrophylla*) yang dikriopreservasi dengan pembekuan lambat (Harding *et al.*, 2000).

KONSERVASI *IN VITRO* UBI-UBIAN DI BERBAGAI LEMBAGA PENELITIAN

Penelitian, pengembangan, dan pemanfaatan teknik kultur *in vitro* untuk konservasi tanaman ubi-ubian telah dilakukan di berbagai pusat penelitian yang berada di bawah naungan *Consortium of International Agricultural Research* (CGIAR), seperti *Bioversity*, CIP, CIAT, dan IITA. CGIAR telah mengembangkan dan menggunakan strategi konservasi *in vitro* secara rutin pada tanaman kentang, ubi jalar, ubi kayu, *Dioscorea* spp., dan pisang di lembaga-lembaga penelitian terkait, juga menerima duplikat kultur *in vitro* yang dikonservasi dari lembaga penelitian lain.

Bioversity, sebelumnya dikenal sebagai *International Plant Genetic Research Institute* (IPGRI) atau *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), menaruh perhatian terhadap pengembangan strategi dan teknologi konservasi dengan menggunakan metode yang tepat, di antaranya konservasi *in vitro* untuk jangka pendek dan jangka panjang (kriopreservasi). *Bioversity* secara rutin menggunakan metode konservasi *in vitro* untuk kentang, ubi jalar, ubi kayu, dan *Dioscorea* di lembaga-lembaga penelitian terkait, juga memberikan pelatihan, bantuan, dan distribusi pustaka yang berhubungan dengan konservasi *in vitro*.

Beberapa bank gen *in vitro* mengoleksi ubi-ubian secara rutin. Sebagai contoh, koleksi *in vitro* terbanyak

terdapat di bank gen *in vitro* CIP (Tay, 2000), terutama untuk ubi jalar dan ganyong yang disimpan dengan metode pertumbuhan lambat untuk penyimpanan jangka menengah (Lizzaraga *et al.*, 1992) dan kriopreservasi untuk penyimpanan jangka panjang (Tay, 2000). Bank gen *in vitro* CIAT mengoleksi lebih dari lima ribu genotipe ubi kayu dengan metode pertumbuhan lambat, yaitu menggunakan pengenceran media dasar atau penurunan taraf sukrosa (Ashmore, 1997) untuk penyimpanan jangka menengah dan kriopreservasi untuk jangka panjang (Thro *et al.*, 1996). CePaCT-SPC memiliki koleksi *in vitro* talas terbanyak yang disimpan dengan metode pertumbuhan lambat (Secretariat of the Pacific Community, 2002; Taylor, 2000), sedangkan IITA telah mengoleksi 1.000 aksesi *Dioscorea* dengan metode pertumbuhan lambat (IITA, 2012). Meskipun BB Biogen belum memiliki bank gen *in vitro* hingga tahun 2012, kegiatan konservasi *in vitro* telah rutin dilakukan untuk tanaman ubi jalar, ubi kayu, dan talas.

Dalam rangka mengembangkan kualitas dan sistem manajemen risiko di bank gen *in vitro*, baik CIAT, CIP maupun IITA telah melakukan perbaikan dan standarisasi prosedur penyimpanan tanaman yang diperbanyak secara vegetatif dan melakukan *safety back up collection* di antara bank gen tersebut, yaitu *black box* ubi jalar di CIAT dan *black box* ubi kayu di CIP (Panta *et al.*, 2009). BB Biogen telah menyimpan koleksi *in vitro* ubi jalar di CIP dan talas di CePaCT sebagai duplikat. Standar bank gen untuk *in vitro* dan kriopreservasi telah disusun oleh FAO (FAO, 2014)

PROSPEK DAN KENDALA APLIKASI KONSERVASI *IN VITRO* DI INDONESIA

Keanekaragaman jenis ubi-ubian dan beragamnya varietas yang ada di Indonesia harus dipertahankan. Teknik kultur *in vitro* dan kriopreservasi dapat digunakan untuk mengonservasi plasma nutfah ubi-ubian karena spesies ini sulit dikonservasi dalam bentuk biji. Banyak peluang penelitian dan pengujian untuk memperoleh metode konservasi *in vitro* yang tepat bagi masing-masing jenis dan varietas, baik dengan teknik pertumbuhan lambat maupun kriopreservasi. Namun demikian, penerapan teknik konservasi secara *in vitro* tentu akan memerlukan biaya, ruangan khusus, peralatan, dan sumber daya manusia (SDM) yang memadai dan terlatih (*skillfull*). Hal ini disebabkan kegiatan mengonservasi harus didukung oleh protokol standar.

Sampai saat ini, dengan teknik induksi pertumbuhan lambat (*slow growth*) dan penghentian per-

tumbuhan dengan suhu sangat rendah (*cryopreservation*), baru beberapa jenis ubi-ubian yang termasuk genus *Ipomoea*, *Manihot*, *Dioscorea*, dan *Amorphophallus* yang telah berhasil dikonservasi, namun kegiatan pengujian kestabilan genetik belum dilakukan pada plasma nutfah yang telah dikonservasi pada jangka waktu tertentu. Kerja sama penelitian tampaknya perlu dilakukan dengan manajemen berada di bawah CGIAR yang lebih maju dalam teknik konservasi *in vitro* untuk meningkatkan pengetahuan dan teknik dari SDM yang ditugaskan untuk mengelola pelestarian plasma nutfah ubi-ubian. Bahan kimia dan beberapa syarat khusus, seperti pasokan aliran listrik yang stabil, khususnya untuk teknik pertumbuhan lambat, dan ketersediaan nitrogen cair serta sistem keamanan (*safety*) dalam penanganan tangki nitrogen cair, khusus untuk kriopreservasi, harus dapat dijamin kontinu.

KESIMPULAN

Kemajuan bidang bioteknologi membuka kesempatan untuk lebih baik lagi dalam usaha konservasi dan pemanfaatan plasma nutfah ubi-ubian di Indonesia. Dengan berbagai keuntungan yang diperoleh dari konservasi plasma nutfah secara *in vitro*, antara lain hemat dalam pemakaian ruangan, dapat menyimpan koleksi tanaman yang hampir punah dan tanaman yang tidak menghasilkan biji, bebas dari cekaman biotik dan abiotik, dan mempermudah distribusi terutama untuk keperluan pertukaran antar negara, maka kultur *in vitro* dapat dipertimbangkan sebagai salah satu metode konservasi yang efektif dan efisien. Kestabilan genetik dari plasma nutfah yang dikonservasi dapat dilakukan bertahap mulai dari analisis morfologi sampai molekuler.

DAFTAR PUSTAKA

- Acedo, V.Z. 1995. Meristem culture and *in vitro* maintenance of Philippines cassava. p. 202-209. In W.M. Roca dan A.M. Thro (eds.) Proceeding of the Second International Scientific Meeting. Cassava Biotechnology Network. Bogor, Indonesia, 22-26 Agustus 1994. Vol. 1. Working Document No. 150. CIAT, Columbia.
- Aladele, S.E. and D.D. Kuta. 2008. Environmental and genotypic effects on the growth rate of *in vitro* cassava plantlet (*Manihot esculenta*). Afr. J. Biotechnol. 7(4):381-385.
- Angel, F., V.E. Barney, J. Tohme, and W.M. Roca. 1996. Stability of cassava at the DNA level after retrieval from 10 years of *in vitro* storage. Euphytica 90:307-313.
- Arteca, R.N. 1996. Plant Growth Substances: Principles and Applications. Chapman and Hall. New York, USA. 345 p.
- Ashmore, S.E. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of the plant genetic resources. International Board for Plant Genetic Resources, Rome. 67 p.
- Benson, E.E., M. Wilkinson, A. Todd, U. Ekuere, and J. Lyon. 1996. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips. CryoLetters 17:119-128.
- Benson, E.E., K. Harding, D. Debouck, D. Dumet, R. Escobar, G. Mafia, B. Panis, A. Panta, D. Tay, I. Van den Huwe, and N. Roux. 2011. Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crops *in vitro* conservation technologies. System-Wide Genetic Resources Program. Rome, Italy. 82 p.
- Bessembinder, J.J.E., G. Staritsky, and E.A. Zandvoort. 1993. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions. Plant Cell Tiss. Org. 33(2):121-127.
- Borges, M., W. Ceiro, S. Meness, N. Aguilera, J. Vazquez, Z. Infante, and M. Fonseca. 2004. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. 76:87-90.
- Cathey, H.M. 1975. Comparative plant growth-retarding activities of ancymidol with ACPC, phosfon, chlormequat, and SADH on ornamental plant species. Hort. Sci. 10(3):204-215.
- Charoensub, R. and S. Phansiri. 2004. *In vitro* conservation of rosecolouredleadwort: Effect of mannitol on growth of plantlets. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 38:97-102.
- 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. p. 401-403. In F. Engelmann and H. Takagi (eds.) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application. JIRCAS, Japan/IPGRI, Rome, Italy.
- Danso, K.E. and B.V. Ford-Llyod. 2011. Cryopreservation of cassava micropagules using simple slow freezing and vitrification techniques. Biotechnol. 10(5):415-420.
- Deguchi, M., Y. Koshita, M. Gao, R. Tao, T. Tetsumura, S. Yamaki, and Y. Kanayama. 2004. Engineered sorbitol accumulation induces dwarfism in Japanese persimmon. J. Plant Physiol. 161:1177-1184.
- Dewi, N. 2002. Perbanyakan dan pelestarian plasma nutfah talas (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) secara *in vitro*. Tesis S2, Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 56 hlm.
- Dewitte, W. and J.A. Murray. 2003. The plant cell cycle. Annu. Rev. Plant Biol. 54:235-264.
- Divakaran, M., K.N. Babu, and K.V. Peter. 2006. Conservation of vanilla species, *in vitro*. Sci. Hort. 110:175-180.
- Dodds, J.H. and L.W. Roberts. 1985. Experiments in Plant Tissue Culture. 2nd Edition. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 232 p.

- Dube, P., M. Gangopadhyay, S. Dewanjee, and M.N. Ali. 2011. Establishment of a rapid multiplication protocol for *Coleus forskohlii* Briq. and *in vitro* conservation by reduced growth. *Indian J. Biotechnol.* 10:228-231.
- Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm-A review. *Euphytica* 7:227-243.
- Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. p. 119-162. In B.V. Ford-Lloyd, H.J. Newbury, and J.A. Callow (eds.) *Biotechnology and Plant Genetic Conservation and Use*. CABI Publishing. Wallingford, UK.
- Engelmann, F. 2000. Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. p. 8-20. In F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application*. JIRCAS, Japan/IPGRI, Rome, Italy.
- Escobar, R.H., G. Mafla, and G.M. Roca. 1997. A methodology for recovering cassava plants from shoot tips maintained in liquid nitrogen. *Plant Cell Rep.*16:474-478.
- Escobar, R.H., D. Debouck, and W.M. Roca. 2000. Development of cassava cryopreservation. p. 222-226. In F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application*. JIRCAS, Japan/IPGRI. Rome, Italy.
- FAO. 2014. *Genebank Standards for Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*. Commission Genetic Resources for Food and Agriculture, Food and Agriculture Organization. 166 p.
- Flach, M. and F. Rumawas. 1996. *Plant Resources of South-East Asia/no. 9, plant yielding non-seed carbohydrates*. Prosea Foundation. Bogor, Indonesia. 237 p.
- George, E.F. and P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Exegetic Ltd. Eversley, Basingtoke, Hans, England. p. 709.
- Golmirzaie, A. and J. Toledo. 1999. *In vitro* conservation of potato and sweet potato germplasm. CIP Program Report 1997-98. International Potato Center. Lima, Peru. p. 351-356.
- Gonzales-Benito M.E., I. Clavero-Ramirez, and J.M. Lopez-Aranda. 2004. The use of cryopreservation for germplasm conservation of vegetatively propagated crops. *Span. J. Agric. Res.* 2(3):341-351.
- Hao, Y.J. and X.X. Deng. 2002. Occurrence of chromosomal variations and plant regeneration from long-term cultured Citrus callus. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38:472-476.
- Harding, K. 1997. Molecular stability of the ribosomal RNA genes in *Solanum tuberosum* plants recovered from slow growth and cryopreservation. *Euphytica* 55(2):141-146.
- Harding K., M. Marzalina, B. Krshnapillay, N.A. Nashatul Zaimah, M.N. Normah, and E.E. Benson. 2000. Molecular stability assessments of trees regenerated from cryopreserved mahogany (*Swietenia macrophylla*) seed germplasm using non-radioactive techniques to examine the chromatin structure and DNA methylation status of the ribosomal RNA genes. *J. Trop. For. Sci.* 12(1):149-163.
- Harijono, T. Estiasih, M.W. Apriliyanti, A. Afriliana, and J. Kusnadi. 2013. Physicochemical and bioactives characteristics of purple and yellow water yam (*Dioscorea alata*) tubers. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 5(4):1691-1701.
- Hassan, N.A., A.A. El-Halwagi, A. Gaber, M. El-Awady, and A. Khalaf. 2007. Slow growth *in vitro* conservation of garlic cultivars grown in Egypt: Chemical characterization and molecular evaluation. *GJMS* 2(2):67-75.
- He, Y.K. and S.J. Li. 1999. Induction and characterization of *in vitro* corm of triploid taro. *Plant Cell Tiss. Org.* 57:173-178.
- Hensaw, G.G. 1987. New technique for germplasm storage. p. 303-313. In A.J. Abbott and R.K. Atkin (eds.) *Improving Vegetatively Propagated Crops*. Academic Press. London, England.
- Hirai, D. and A. Sakai. 2003. Simplified cryopreservation of sweetpotato (*Ipomoea batatas* [L.] by optimizing conditions for osmoprotectant. *Plant Cell Rep.* 21:961-966.
- Hofmannová, J., K. Schwarzerová, L. Havelková, P. Boríková, J. Petrásek, and Z. Opatrný. 2008. A novel, cellulose synthesis inhibitory action of ancyimidol impairs plant cell expansion. *J. Exp. Bot.* 59(14):3963-3974.
- IITA. 2012. Yam *in vitro* gene banking. International Institute of Tropical Agriculture. http://www.iita.org/c/document_library/get_file?--uuid=a930e51c-6c47-4073-89d3-224900b1d72c&groupId=25357. [7 November 2012].
- Kartha, K.K. and F. Engelmann. 1994. Cryopreservation and germplasm storage. p. 195-230. In I. Vasil and T. Thorpe (eds.) *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic Publisher. Netherland.
- Keatmetha, W., M. Mekanawakul, and S. Te-Chato. 2006. *In vitro* germplasm conservation of *Garcinia mangostana* L. and *Lansium domesticum* Corr. *Walailak J. Sci. Tech.* 3(1):33-50.
- Keller, E.R.J., A. Senula, S. Leunufna, and M. Gröbe. 2006. Slow growth storage and cryopreservation-tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections. *Int. J. Refrig.* 29:411-417.
- Kyesmu, P.M. and H. Takagi. 2000. Cryopreservation of shoot apices of yams (*Dioscorea* species) by vitrification. p. 411-413. In F. Engelmann and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application*. JIRCAS, Japan/IPGRI, Rome, Italy.

- Leunufna, S. 2007. Kriopreservasi untuk konservasi plasma nutfah tanaman: Peluang pemanfaatannya di Indonesia. *J. AgroBiogen* 3(2):80-88.
- Lizzaraga, R., A. Panta, N. Espinoza, and J.H. Dodds. 1992. Tissue culture of *Ipomoea batatas*: Micropropagation and maintenance. CIP Research Guide 32. Sweet potato Germplasm Management. International Potato Center. Lima, Peru. 21 p.
- Malaurie, B., O. Pungu, R. Dumont, and M.F. Trouslot. 1993. The creation of *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation. *Euphytica* 68:113-122.
- Malaurie, B., M.F. Truslot, J. Berthaud, M. Bousalem, A. Pinel, and J. Dubern. 1998. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. *Electron. J. Biotech.* 1(3):103-117.
- Mandal, B.B. 2000. Cryopreservation of yam apices: A comparative study with three different techniques. p. 233-237. *In* F. Engelmann and H. Takagi (eds.) Cryopreservation of Tropical Germplasm. Current Research Progress and Application. JIRCAS, Japan/IPGRI, Rome, Italy.
- Mandal, B.B. and K.P.S. Chandel. 1996. Conservation of genetic diversity in sweet potato and yam using *in vitro* strategies. p. 49-54. *In* G.T. Kurup, M.S. Palaniswami, V.P. Potty, G. Padmaja, and S. Kabeerathamma (eds.) Tropical Tuber Crops: Problem, Prospect and Future Strategies. Science Publishers Inc. Lebanon, USA.
- Mandal, B.B., K.P.S. Chandel, and S. Diwvedi. 1996. Cryopreservation of yam (*Dioscorea* spp.) shoot apices by encapsulation-dehydration. *CryoLetters* 17:165-174.
- Mandal, B.B., S.S. Ahuja-Ghosh, and P.S. Srivastava. 2008. Cryopreservation of *Dioscorea rotundata* Poir: A comparative study with two cryogenic procedures and assessment of true-to-type regenerated by RAPD analysis. *CryoLetters* 29:399-408.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-397.
- Ng, S.Y.C. and N.Q. Ng. 1997. Germplasm conservation in food yam (*Dioscorea* spp): Constraint, application and future prospects. p. 257-286. *In* M.K. Razdan and E.C. Cocking (eds.) Conservation of Plant Genetic Resources *In Vitro*. Vol. 1: General Aspects. Science Publishers Inc. Enfield, USA.
- Ng, S.Y.C. and N.Q. Ng. 2000. Cryopreservation of cassava and yam shoot-tips by fast freezing. p. 418-420. *In* F. Engelmann and H. Takagi (eds.) Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application. JIRCAS, Japan/IPGRI, Rome, Italy.
- Nugraheni, M., U. Santoso, Suparmo, and H. Wuryastuti. 2011. *In vitro* antioxidant, antiproliferative and apoptosis effect of *Coleus tuberosus* L. *Afr. J. Food Sci.* 5(4):232-241.
- Panis, B., B. Piette, and R. Swennen. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci.* 168:45-55.
- Panta, A., D. Tay, R. Gomez, B. Zea, E. Rojas, R. Simon, and W. Roca. 2009. Status and impact of the *in vitro* conservation of root and tubers at the International Potato Center (CIP). 15th Triennial of the Symposium of the International Society for Tropical Root Crops (ISTRIC). International Potato Center. Lima, Peru, 2-6 November, 2009. 24 p.
- Peredo, E.L., R. Arroyo-García, B.M. Reed, and M.Á. Revilla. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* 57:234-241.
- Pinchera, R.G. and K.A. Fletchev. 1994. Paclobutrazol and ancymidol protect corn seedling from high and low temperature stresses. *Plant Growth Regul.* 15:47-53.
- Pookmanee, T., R. Amphawan, N. Topoonyamont, and N. Wichit. 2001. *In vitro* germplasm preservation of *Amorphophallus oncophyllus* Prain ex Hook. F. p. 145-155. Proceeding of the 3rd Maejo University Annual Conference. Maejo University, Chiang Mai, Thailand.
- Ramkrishna, N. Khawale, and S.K. Singh. 2005. *In vitro* adventitive embryony in citrus: A technique for citrus germplasm exchange. *Curr. Sci.* 88(8):1309-1311.
- Reed, B.M. 2001. Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters* 22:98-104.
- Roostika, I. dan N. Sunarlim. 2001. Penyimpanan *in vitro* tunas ubi jalar dengan penggunaan paclobutrazol dan ancymidol. *J. Pen. Pert. Tan. Pangan* 20(3):48-56.
- Roostika, I., I. Mariska, dan N. Sunarlim. 2004a. Penyimpanan ubi kayu (*Manihot utilissima*) secara kriopreservasi dengan teknik vitrifikasi. *J. Bioteknologi Pertanian* 9(1):8-13.
- Roostika, I., I. Mariska, G. A. Wattimena, N. Sunarlim, dan M. Kosmiatri. 2004b. Kriopreservasi Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) secara enkapsulasi-vitrifikasi. *J. Pen. Pert. Tan. Pangan* 22(3):159-166.
- Roostika, I., N. Sunarlim, dan A.V. Novianti. 2005. Penyimpanan kentang hitam (*Coleus tuberosus*) secara kultur *in vitro*. *J. Pen. Pert. Tan. Pangan* 24(1):46-52.
- Sakai, A. 2004. Plant cryopreservation. p. 329-245. *In* B.J. Fuller, N. Lane, and E.E. Benson (eds.) Life in the Frozen State. CRC Press. London, UK.
- Sakai, A. and F. Engelmann. 2007. Vitrification, encapsulation vitrification and droplet vitrification: A review. *CryoLetters* 28(3):151-172.
- Sakai, A., D. Hirai, and T. Niino. 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. p. 33-57. *In* B. Reed (ed.) Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer. New York, USA.

- Sant, R., B. Panis, M. Taylor, and A. Tyagi. 2008a. Cryopreservation of shoot tips by droplet-vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell Tiss. Org.* 92:107-111.
- Sant, R.M., M.A. Taylor, and A. Tyagi. 2008b. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot-tips of tropical taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) by vitrification. *CryoLetters* 27(3):133-142.
- Sarkar, D., S.K. Chakrabarti, and P.S. Naik. 2001. Slow-growth conservation of potato microplants: Efficacy of ancymidol for long-term storage *in vitro*. *Euphytica* 117:133-142.
- Secretariat of the Pacific Community. 2002. Taro Genetic Resources: Conservation and Utilization. AusAID/SPC. Annual Report 2001/2002. Secretariat of the Pacific Community (SPC). Suva, Fiji. 90 p.
- Shawky, B. and U.I. Aly. 2007. *In vitro* conservation of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) germplasm. *Int. J. Agri. Biol.* 9(3):404-407.
- Shukla, N., N.S. Sangwan, O.H. Misra, and R.S. Sangwan. 2004. Characterization of *Boerhavia diffusa* L. mutant lines by RAPD and isozyme selected for agronomically valuable traits. *J. Gen. Breed.* 58:37-46.
- Staritsky, G.A.J., Dekkers, N.P. Louwars, and E.A. Zandvoort. 1986. *In vitro* conservation of aroid germplasm at reduced temperature and under osmotic stress. p. 277-280. *In* L.A. Withers and P.G. Anderson (eds.) *Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications*. Butterworths, London, England.
- Sudarmonowati, E. 2000. Cryopreservation of tropical plants: Current research status in Indonesia. p. 291-296. *In* F. Engelmenn and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application*. JIRCAS, Japan/IPGRI, Rome, Italy.
- Sunarlim, N., A.V. Novianti, dan I. Rostika. 2004. Penyimpanan *in vitro* gembili melalui pertumbuhan minimal. hlm. 267-275. *Dalam* A.K. Makarim *et al.* (eds.) *Kinerja Penelitian Mendukung Agribisnis Kacang-kacangan dan Umbi-umbian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor.*
- Sunarlim, N., Minantyorini, dan W.H. Adil. 1999. Penyimpanan ubi jalar secara *in vitro* dengan pertumbuhan minimal. *Bul. Plasma Nutfah* 5(1):1-5.
- Takagi, H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. p. 178-193. *In* F. Engelmenn and H. Takagi (eds.) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. Current Research Progress and Application*. JIRCAS, Japan/IPGRI, Rome, Italy.
- Takagi, H., N. Tien-Thinh, O.M. Islam, and T. Senboku. 1997. Cryopreservation of *in vitro* grown shoot tip of taro (*Colocasia esculenta* [L.] Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic condition of the vitrification. *Plant Cell Rep.* 16:594-599.
- Tay, D. 2000. Model genebank concept: CIP genebank. 15th Triennial of the Symposium of the International Society for Tropical Root Crops (ISTRIC). International Potato Center. Lima, Peru, 2-6 November 2009. 24 p.
- Taylor, M. 1996. Taro tissue culture. *JOSPA* 3(1-2):1-9.
- Taylor, M.B. 2000. New regional gene bank in Fiji was made-to-order for Pacific Island Nations: High-tech methods complement region's germplasm, expedite access. *Diversity* 16(4):19-21.
- Thro, A.M., W.M. Roca, and G. Henry. 1996. The cassava biotechnology network (CBN) and cassava biotechnology research. p. 13-20. *In* G.T. Kurup, M.S. Palaniswami, V.P. Potty, G. Padmaja, and S. Kabeerathumma (eds.) *Tropical Tuber Crops: Problem, Prospect and Future Strategies*. Science Publishers Inc. Lebanon, USA.
- Tyas, K.N., S. Susanto, I.S. Dewi, dan N. Khumaida. 2012. Konservasi pamelon (*Citrus maxima* [Burm.] Merr.) dengan penurunan konsentrasi medium dan sukrosa. *Bul. Kebun Raya* 15(2):103-113.
- Tyas, K.N., S. Susanto, I.S. Dewi, dan N. Khumaida. 2013. Konservasi *in vitro* pamelon (*Citrus maxima* [Burm.] Merr.) melalui pertumbuhan lambat. *J. Agron. Indonesia* 41(1):32-39.
- Towill, L.E. 2005. Germplasm preservation. p. 277-284. *In* R.N. Trigiano and D.J. Gray (eds.) *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Towill, L.E. and R.L. Jarret. 1992. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) shoot by vitrification. *Plant Cell Rep.* 11:175-178.
- Unnikrishnan, M., N.G. Nair, and G.G. Nayar. 1992. Preliminary studies on conservation of germplasm of tuber crops through *in vitro* cultures. p. 51-55. *In* N.S.S. Rao, C. Balagopalan, and S.V. Ramakrishna (eds.) *New Trends in Biotechnology*. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd. New Delhi, India.
- Withers, L.A. 1991. *In vitro* conservation. *Biol. J. Linnean Soc.* 43:31-42.
- Xin, S.Y. 1988. Studies on *in vitro* storage of sweet potato germplasm. *Crop Germplasm* 2:24-26.
- Zandvoort, E.A., M.J.H. Hulshof, and G. Staritsky. 1994. *In vitro* storage of *Xanthosoma* spp. under minimal growth condition. *Plant Cell Tiss. Org.* 36:309-316.
- Zhang, Y.J., X.G. Zhang, J. Pang, and P.Y. Liu. 2001. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Amorphophallus* by vitrification. http://en.cnki.com.cn/article_en/CDFDTOTAL-XBZW200101016.htm. [14 September 2012].