

REGENERASI TANAMAN OBAT KELADI TIKUS (*Thyponium flagelliform* L. Blume) MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK SECARA *IN VITRO*

¹Juwartina Ida Royani, ²Indah Sulistyorini, ³Dwi Rizkyanto Utomo

Laboratorium Mikropropagasi Tanaman

Balai Pengkajian Bioteknologi, BPPT

Gd. 630 Kawasan PUSPIPTEK Serpong Tangerang 15314

Email: juwartina.ida@bppt.go.id

Abstract

Somatic embryogenesis is a process whereby somatic cells have differentiation in somatic embryos and it's formed from embryonic cells due to the high polarization of uncontrolled cell division. The aim of this research is to produced shoots of rodent tuber via somatic embryos. Induction of somatic embryos from explants in MS media with N (2-chloro-4-pyridyl)-N-phenyl urea (CPPU) and continuous subculture in MS media without plant growth regulator for 1 month. Plantlet regeneration growth in liquid MS media with BAP and IBA fortified with 40 gr/l of sucrose in the dark. The result showed that somatic embryonic appears in media induction after 2 week and plantlet regeneration in 4 week. All plantlet grewed from embryo somatic can survive 100% in field with normal shoot.

Key words: somatic embryogenesis, rodent tuber, in vitro, CPPU, BAP

1. PENDAHULUAN

Somatik embryogenesis adalah suatu proses dimana sel somatik terdeferensiasi menjadi embrio somatik (George, *et al.* 2008). Somatik embryogenesis terbentuk dari sel embrionik yang terpolarisasi oleh karena tingginya pembelahan sel yang terkontrol. Somatik embryogenesis dapat terdeferensiasi secara langsung tanpa melalui fase kalus seperti pada daun *Nymphoides cristatum* (Niranjan, *et al.* 2008) atau secara tidak langsung melalui fase kalus seperti pada *Arachis glabrata* (Vidoz, *et al.* 2004).

Menurut Purnamaningsih (2002), faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukan embrio somatik adalah jenis eksplan, sumber nitrogen dan gula, serta zat pengatur tumbuh. Somatik embryogenesis dapat terbentuk dari berbagai bagian tanaman seperti dari embrio immature *Helianthus annuus* L (Finer, 1987), daun *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill (Chandrasekhar, *et al.*, 2006), hipokotil *Brassica napus* (Majd, *et al.* 2006), kotiledon *Jatropha curcas* (Kalimuthu, *et al.*, 2007), bunga *Musa acuminata* (Sidha, *et al.* 2006) dan petiole *Begonia x hiemalis* Fotsch (Awal, *et al.* 2008).

Dikatakan dalam George, *et al.* (2008) bahwa regenerasi tanaman melalui proses embryogenesis somatik terdiri dari lima tahapan yaitu tahapan inisiasi embrionik kultur dengan memaparkan eksplan pada media yang mengandung zat pengatur tumbuh, tahapan

proliferasi embrionik kultur pada media padat atau cair, tahapan pre-maturasi dari embrio somatik pada media tanpa zat pengatur tumbuh, tahapan maturasi embrio somatik dan tahapan regenerasi tanaman.

Somatik embryogenesis dapat menjadi sarana untuk menghasilkan alkaloid pada *Corydalis ambigua* (Hiraoka, *et al.* 2004), peningkatan kadar komponen bioaktif acemannan pada *Aloe barbadensis* Mill (Garro-Monge, *et al.* 2008) dan manipulasi genetik dengan transformasi pada *Coffea arabica* L (Gatica-Arias, *et al.*, 2008). Somatik embryogenesis adalah salah satu alternatif terbaik untuk meregenerasikan tanaman dari sel tunggal atau protoplas (George, *et al.* 2008).

Keladi tikus (*Thyponium flagelliforme* (Lodd) BL) merupakan tanaman obat asli Indonesia (Syahid, 2007). Kandungan senyawa aktif keladi tikus mengandung antineoplastik atau antikanker selain juga bisa berkhasiat sebagai antivirus. Ekstrak umbi dan akar keladi tikus serta bahan alami lainnya dapat membantu detoxifikasi jaringan darah. Efek farmakologi inilah yang ditengarai menjadi obat utama untuk mengatasi kanker stadium lanjut. Dari hasil analisa fitokimia umbi keladi tikus menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid, saponin, steroid dan glikosida (Syahid, 2007).

Perbanyakan tanaman keladi tikus secara *in vitro* telah mulai banyak dilakukan baik dengan regenerasi melalui kalus dari daun menjadi

plantlet (Syahid dan Kristina, 2007), dengan umbi menjadi plantlet (Royani, dkk, 2008) dan dari satu tunas menjadi multiplikasi tunas dengan metode aerasi (Yee, 2003). Tetapi perbanyakkan keladi tikus melalui embryogenesis somatik belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman keladi tikus melalui proses embriogenesis somatik.

2. BAHAN DAN METODE

Bahan dan sterilisasi. Umbi keladi tikus (*Thyponium flagelliform* L. Blume) digunakan sebagai eksplan dan dikoleksi di sekitar Kawasan PUSPIPTEK Serpong Tangerang.

Sterilisasi umbi. Sterilisasi pada umbi keladi tikus dimulai dengan pengambilan mata tunas dari umbi dengan ukuran 0,5 cm x 0,5 cm x 0,5 cm untuk kemudian dicuci bersih dengan menggunakan air mengalir. Eksplan selanjutnya direndam dalam larutan pembersih lantai (mengandung *benzalkoniumchloride* 1,5%) selama 3 menit, dilanjutkan dengan pemberian alkohol 70% selama 3 menit. Kemudian eksplan direndam dalam larutan pembersih lantai kembali selama 30 menit dan air mengalir selama 1 jam, selanjutnya eksplan direndam dalam bakterisida dan fungisida 2 gr/l selama 1 jam. Perlakuan sterilisasi dalam laminar air flow adalah perendaman dalam larutan pemutih baju 5% (mengandung 5,25% NaOCl) selama 5 menit kemudian direndam kembali dalam larutan pemutih baju 5% selama 5 menit dan terakhir dalam larutan antibiotik selama 30 menit. Eksplan kemudian ditanam di media MS tanpa zat pengatur tumbuh (MS0) untuk mengetahui ada tidaknya kontaminasi.

Induksi kalus. Induksi kalus dari umbi keladi tikus dilakukan pada dua media induksi yaitu media Murashige and Skoog (MS, 1962) dengan zat pengatur tumbuh berupa N(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (CPPU) dan media MS dengan zat pengatur tumbuh berupa benzyl amino purine (BAP). Masing-masing media ditambahkan pematat dengan konsentrasi 8 gr/l.

Induksi embrio somatik. Setelah dilakukan induksi kalus pada masing-masing media induksi, kalus disubkultur pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh (MS0) untuk menginduksi pembentukan embrio somatik.

Regenerasi plantlet. Embrio somatik yang telah terbentuk kemudian disubkultur pada media regenerasi plantlet. Media yang digunakan untuk regenerasi plantlet adalah media MS cair dengan penambahan zat pengatur tumbuh berupa BAP dan IBA serta penambahan sukrosa sebanyak 40 gr/l.

Media Pendewasaan plantlet. Media yang digunakan untuk pendewasaan plantlet adalah media MS0 dengan pematat. Induksi kalus dilakukan diruang termostatik pada suhu 25°C ± 2°C dengan penyinaran selama 16 jam. Sedangkan regenerasi plantlet dilakukan diruang kultur dengan suhu yang sama dengan penggoyangan dan diinkubasi pada kondisi gelap.

Aklimatisasi Plantlet. Aklimatisasi plantlet dilakukan dengan cara plantlet hasil embrio somatik dibersihkan akarnya dari agar yang menempel dengan air mengalir sampai bersih. Plantlet ditanam pada polibag dengan ukuran 15x15 cm dengan media tanam berupa pupuk kandang: pasir: tanah dengan perbandingan 1:1:1. Plantlet dalam polibag ditempatkan pada sungkup-sungkup plastik dan disiram setiap hari. Setelah 4 minggu setelah tanam bibit hasil aklimatisasi dipindahkan di *screen house*.

Pengamatan dilakukan terhadap beberapa parameter berupa warna kalus, bentuk kalus, embrio somatik yang terbentuk, jumlah tunas, tinggi tunas, jumlah daun dan pertumbuhan plantlet secara *in vitro* serta tinggi tunas, jumlah daun dan pertumbuhan setelah aklimatisasi.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Induksi kalus

Induksi kalus embrionik dari umbi keladi tikus terjadi pada minggu ke 2 setelah tanam. Induksi kalus dapat terjadi pada kedua media yang dicobakan baik dengan penambahan zat pengatur tumbuh CPPU maupun BAP. Kalus viabel dari umbi keladi tikus yang terbentuk berwarna kekuningan dengan bentuk remah dan mudah hancur.

Tabel 1. Kalus yang terbentuk pada media induksi kalus

| Media induksi | Warna kalus | Bentuk kalus |
|---------------|--------------------------|----------------------------------|
| MS + CPPU | kuning bening kecoklatan | Viabel, remah dan mudah pecah |
| MS + BAP | putih bening kekuningan | Viabel, bulat-bulat, bergerombol |

Pada media MS yang mengandung BAP selain remah dan mudah hancur kalus yang terbentuk bulat-bulat dan bergerombol. Penelitian yang telah dilakukan Syahid dan Kristina (2007) pada kalus keladi tikus juga mendapatkan bentuk kalus dengan tekstur sebagian remah, agak mudah

lepas dan sebagian remah dan padat. Bentuk dan warna kalus pada tiap perlakuan dapat dilihat pada gambar 1.

Induksi pembentukan kalus embrionik dengan menggunakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin jarang dilakukan. Biasanya induksi kalus menjadi somatik embrio dilakukan pada media yang mengandung zat pengatur tumbuh berupa auksin yaitu 2,4-D seperti pada tanaman *Glycine max* (Korbes, *et al.* 2005), penggunaan IAA pada tanaman *Corydalis ambigua* (Hiraoka, *et al.* 2004) dan penggunaan NAA pada *Theobroma cacao* L (Chantrapradist and Kanchanapoom, 1995).

Pada penelitian ini dilakukan induksi dengan sitokinin untuk menginduksi pembentukan kalus embrionik yang dapat membentuk embrio somatik. Induksi kalus dengan menggunakan sitokinin dan menghasilkan embrio somatik juga telah diaplikasikan pada *Jatropha curcas* menggunakan BAP dari eksplan kotiledon (Kalimuthu, *et al.*, 2007). Sedangkan pada *Nymphoides cristatum* pemakaian TDZ tunggal membentuk embrio somatik tetapi pada pemakaian 2,4-D tunggal tidak terbentuk (Niranjan, *et al.* 2008).



Gambar 1. Perbandingan kalus embrionik dari media induksi kalus dengan CPPU (A) dan BAP (B).

3.2. Induksi embrio somatik.

Kalus embrionik yang terbentuk dari kedua media induksi tersebut disubkultur pada media MS tanpa

zat pengatur tumbuh. Hal ini dilakukan untuk mengetahui respon kalus embrionik pada media induksi dan memacu pembentukan embrio somatik. Dikatakan oleh George, *et al.* (2008) bahwa perlakuan ini dapat meningkatkan proliferasi dan menstimulir formasi embrio somatik dan perkembangan awal dari embrio. Subkultur kalus embrionik dari media dengan zat pengatur tumbuh kedalam media tanpa zat pengatur tumbuh juga dilakukan pada *Asparagus officinalis* L (Delbrei and Jullien, 1994), *Andrographis paniculata* (Martin, 2004) dan *Vitis vinifera* L (Gok Tangolar, *et al.* 2008) dengan tujuan untuk memacu dan meningkatkan jumlah somatik embrio yang terbentuk.

Dari kedua media yang digunakan untuk induksi, kalus embrionik pada media CPPU dapat terpacu menghasilkan embrio somatik setelah dipaparkan pada media MS0 selama 2-3 MST. Sedangkan pada media dengan BAP, kalus tidak terpacu menjadi embrio somatik tetapi tetap berproliferasi. Embrio somatik yang dihasilkan berwarna putih bening kekuningan dan berada pada kondisi pertumbuhan.



Gambar 2. Somatik embrio yang terbentuk dari media induksi yang mengandung CPPU disubkultur pada media MS0 berumur 3 MST

CPPU atau *forchlorofenuron* adalah zat pengatur tumbuh dari golongan phenylurea yang mempunyai aktivitas seperti sitokinin (George, *et al.* 2008). Pengaruh penggunaan CPPU untuk menginduksi embrio somatik juga telah diaplikasikan pada *Pellargonium*, bersinergis dengan golongan sitokinin yang lain yaitu TDZ (Murthy *et al.*, 1996; Mithila *et al.*, 2001).

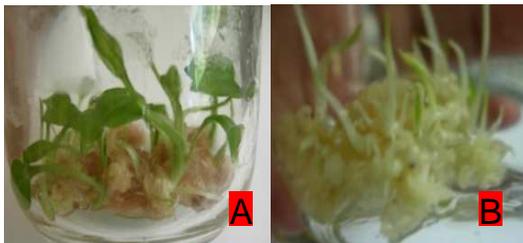
3.3. Regenerasi plantlet.

Regenerasi plantlet dilakukan pada media cair dengan penggojokan untuk menghomogenkan media. Hasil proliferasi kalus dan somatik embrio yang terbentuk pada media MS0 disubkultur pada media MS cair dengan penambahan BAP dan IBA serta peningkatan kadar sukrosa sebesar 40 gr/l. Penggunaan konsentrasi gula melebihi normal sebesar 40 gr/l juga dapat meningkatkan pembentukan embrio somatik. Pada kondisi ini pemberian gula di samping berfungsi sebagai sumber karbon, juga berguna untuk mempertahankan tekanan osmotik media (Purnamaningsih, 2002).

Tabel 2. Respon dan jumlah tunas pada media regenerasi plantlet.

| Bentuk Eksplan | Rata-Rata Jumlah Tunas | Pertumbuhan Plantlet |
|-----------------|------------------------|----------------------|
| Kalus embrionik | 20 ± 0.78 | Normal |
| Somatic embrio | 11 ± 1.25 | Normal |

Regenerasi plantlet dari kalus embrionik dan somatic embrio mulai terbentuk dalam waktu 4 minggu setelah tanam. Tunas yang terbentuk pada embrio somatik hasilnya lebih banyak dibandingkan pada kalus embrionik pada media yang sama. Hasil regenerasi plantlet dari kalus dan embrio somatic dapat dilihat pada Gambar 3.



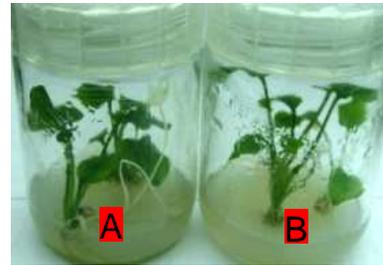
Gambar 3. Regenerasi plantlet pada media MS+BAP+IBA cair. Plantlet dari kalus (A) 4 MST dan dari embrio somatik (B) 2 MST.

3.4. Pendewasaan Plantlet.

Plantlet dari hasil regenerasi yang berasal dari kalus maupun yang berasal dari embrio somatik mengalami pertumbuhan yang normal seperti pada kebanyakan yang terjadi secara langsung tanpa melalui fase kalus atau embriogenesis. Baik bentuk batang, daun maupun akar tidak menunjukkan abnormalitas. Tinggi plantlet pada masing-masing tunas dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata tinggi dan jumlah daun pada tunas hasil regenerasi dari embryo somatik dan kalus.

| Media | Rata-rata Tinggi tunas (cm) | Rata-rata Jumlah daun |
|-----------|-----------------------------|-----------------------|
| MS + CPPU | 6.19 ± 1.67 | 5.50 ± 1.80 |
| MS + BAP | 4.52 ± 1.08 | 5.50 ± 1.00 |

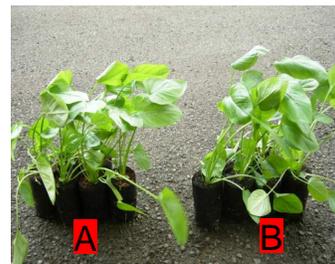


Gambar 4. Pendewasaan plantlet dari regenerasi kalus berumur 2 MST (A) dan dari embrio somatik berumur 6 MST pada media MS0 (B)

Rata-rata tinggi tunas plantlet keladi tikus hasil regenerasi secara embrio somatik lebih tinggi dibandingkan dengan regenerasi melalui kalus. Sedangkan pada jumlah daun rata-rata yang dihasilkan adalah sama.

3.5. Aklimatisasi Plantlet

Hasil aklimatisasi tanaman keladi tikus baik yang berasal dari regenerasi embrio somatik maupun yang berasal dari regenerasi kalus dapat beradaptasi 100% pada lingkungan luar. Pertumbuhan keladi tikus yang dihasilkan mempunyai daun, batang dan akar yang normal seperti pada kebanyakan secara konvensional dan tidak terjadi variasi morfologi. Hasil ini tidak berbeda dengan embryogenesis yang terjadi pada tanaman obat *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill dengan morfologi yang normal setelah aklimatisasi (Chandrasekhar, et al., 2006).



Gambar 5. Aklimatisasi keladi tikus hasil regenerasi dari kalus (A) dan dari embrio somatik (B) 8 MST.

Dari rata-rata tinggi tunas keladi tikus baik yang dihasilkan dari regenerasi kalus maupun embryo somatik dapat dilihat pada Tabel 4. Tinggi tunas keladi tikus yang dihasilkan mempunyai rata-rata yang sama yaitu 27 cm. Sedangkan untuk jumlah daun lebih banyak pada tunas yang dihasilkan dari regenerasi kalus.

Table 4. Rata-rata tinggi dan jumlah daun pada aklimatisasi tunas hasil regenerasi dari embryo somatik dan kalus.

| Media | Rata-rata Tinggi tunas (cm) | Rata-rata Jumlah daun |
|-----------|-----------------------------|-----------------------|
| MS + CPPU | 27.45 ± 2.60 | 9.50 ± 1.76 |
| MS + BAP | 27.83 ± 1.91 | 12.45 ± 4.05 |

4. KESIMPULAN

Induksi kalus embrionik dari keladi tikus dapat dilakukan pada media MS baik pada penambahan CPPU maupun BAP. Induksi embrio somatik terjadi pada kalus embrionik dari hasil induksi media MS dengan penambahan CPPU pada media MS0. Plantlet Keladi tikus dapat terregenerasi baik melalui kalus maupun melalui embrio somatik. Tanaman keladi tikus yang dihasilkan dari proses somatik embryogenesis dan kalus mengalami pertumbuhan yang normal.

DAFTAR PUSTAKA

Awal A., R.M. Taha, N.A. Hasbullah. 2008. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in *Begonia x hiemalis* Fottsch *in vitro*. *J. of Biological Sciences*. 8(5): 920-924.

Chandrasekhar T., T. Mohammad Hussain, G. Rama Gopal, and J. V. Srinivasa Rao. 2006. Somatic Embryogenesis of *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill., an Important Medicinal Plant *International Journal of Applied Science and Engineering*. 4, 1: 33-40.

Chantrapradist and Kanchanapoom. 1995. Somatic Embryo Formation from Cotyledonary Culture of *Theobroma cacao* L. *J. Sci. Soc. Thailand*. 21:125-130.

Finer J.J. 1987. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L) on a high sucrose containing medium. *Plant Cell Reports*. 6 (5): 372-474.

Garro-Monge, G., A. M. Gatica-Arias and Marta Valdez-Melara. 2008. Somatic Embryogenesis, Plant Regeneration and Acemannan Detection in Aloe (*Aloe barbadensis* Mill.) *Agronomía Costarricense* 32(2): 41-52.

Gatica-Arias, A. M., G. Arrieta-Espinoza and A. M. E. Esquivel. 2008. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 11 No. 1, Issue of January 15, 2008.

George, E.F, M. A. Hall and G. J. De Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture 3th Edition*. Volume 1: The Background. Springer. Netherland.

Gok Tangolar, S., Saadet Buyukalaca, and Fuat Ergenoglu. 2008. High Efficiency Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryos of Grapevine: The Effect of Genotype, Media, 2,4-D, and Incubation Conditions. *Turk. J. Agric For* 32 : 311-317.

Hiraoka N, I. D. Bhatt and Y. Sakurai, J. In Chang. 2004. Alkaloid production by somatic embryo cultures of *Corydalis ambigua*. *Plant Biotechnology*. 21(5): 361-366.

Juwartina Ida Royani, Syofi Rosmalawati, Suparjo, Teuku Tajuddin, Bambang Marwoto, Indah Sulistyorini, Dwi Rizkyanto dan Wahyu Mustaqim. 2008. *In Vitro Propagation of Rodent tuber (Thyponium flagelliforme Lodd) as Medicinal Plant Native from Indonesia*. *Prosiding of the International Biotechnology Conference 2008, Bogor August 5-7, 2008*.

Kalimuthu K., S. Paulsamy, R. Senthilkumar and M. Sathya. 2007. In vitro Propagation of the Biodiesel Plant *Jatropha curcas* L. *Plant Tissue Cult. & Biotech*. 17(2): 137-147.

Körbes, A. P and A. Droste. 2005. Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.40, n.3, p.211-216.

Majd, A. F. Chamandoosti, S. Mehrabia and M. Sheidai. 2006. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in *Brassica napus* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 9(4):729-734.

Martin K.P., 2004. Plant Regeneration Protocol of Medicinally Important *Andrographis paniculata*

- (Burm. F.) Wallich Ex Nees via Somatic Embryogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 40:204-209.
- Mithila J., S. Murch, J. S. Krishnaraj, and P. K. Saxena, 2001. Recent advances in *Pelargonium* in vitro regeneration systems. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, October 67 (1): 1-9.
- Murthy B. N. S., R.P. Singh and K P. Saxena. 1996. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargoniumx hortorum* Bailey cv Ringo Rose) cotyledonary cultures. Plant Cell Reports. 15(6): 423-426.
- Nirnanjan M.H., M.S. Sudarshana and S.T. Girisha. 2008. Direct somatic Embryogenesis and plant Regeneration from Leaf Explants of *Nymphoides cristatum*: A Medicinally Important Plant Global Journal of Biotechnology & Biochemistry. 3 (2): 79-82.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. Buletin AgroBio 5(2):51-58.
- Sidha, M, P. Suprasanna, V. A. Bapat, U.G. Kulkarni and B.N. Shinde. 2006. Developing Somatic Embryonic Culture System and Plant Regeneration in Banana. National Symposium on Plant Biotechnology held at Dehra Dun, October 12-14, 2006.
- Syahid, S.F. 2007. Keladi tikus (*Thyponium flagelliforme*), tanaman Obat yang berpeluang menyembuhkan kanker. Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri. Vol. 13. No.1.20-23.
- Syahid, S.F. dan N. N. Kristina. 2007. Induksi dan regenerasi kalus keladi tikus (*Typonium flagelliforme*. Lodd.) secara in vitro. Jurnal Littri 13(4): 142 – 146.
- Vidoz, M. L., H. Y. Rey, A. M. Gonzalez and L. A. Mroginski. 2004. Somatic embryogenesis and Plant Regeneration through leaf culture in *Arachis glabrata* (Leguminosae). Acta Physiologiae Plantarum. 26(1):59-66.
- Yee, K. W. and Chan LaiKeng. 2003. Micropropagation of *Typhonium flagelliforme* in immersion cultures. J. of Tropical Medicinal Plants. 2003 (Vol. 4) (No. 1) 91-95.