Hayati, Juni 1994, hlm. 15-17
ISSN 0854-8587
Vol. 1, No. 1

Induksi Kalus dan Regenerasi *Dioscorea composita* Hemsl

ISNAINI NURWAHYUNI* DAN PUSPA DEWI TJONDRONEGORO
Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jl. Raya Pajajaran, Bogor 16144

Diterima 2 Mei 1994/Disetujui 18 Juni 1994

Callus induction and planlet regeneration of *D. composita* Hemsl are described. Nodal cuttings and young seeds of *D. composita* were induced to produce callus and planlets on modified MS medium, that are supplemented with various concentrations of growth regulators and 0.8% agar. In the culture of nodal segments, a single plantlet was produced by the proliferation of axillary buds and was not from the undifferentiated callus. However, from seed cultures, embryogenic callus was able to be regenerated to plantlets after subculturing into regeneration medium.

PENDAHULUAN

Dioscorea composita merupakan satu dari 650 jenis *Dioscorea* (Coursey, 1967; Ayensu, 1972) yang berasal dari Meksiko Selatan. Tanaman ini tumbuh normal pada ketinggian 150-400 dari permukaan laut (van Steenis, 1981). Di Kabupaten Bogor, *D. composita* cocok ditanam di daerah Cimanggu dan Cibinong.

Dioscorea composita, *D. floribunda*, dan *D. mexicana* merupakan penghasil diosgenin, yaitu bahan obat-obatan steroid seperti pil kontraseptik dan kortison. Kadar diosgenin pada umbi *D. composita* berkisar antara 0-13% dari berat kering (Coursey, 1967). Hasil percobaan Balai Penelitian Tanaman Obat Bogor menunjukkan bahwa kadar diosgenin tertinggi mencapai 7.2% berat kering umbinya (Sudiarto, *et al.*, 1985).

Penyediaan bibit budidaya *D. composita* merupakan kendala yang membatasi. Bibit jarang terbentuk karena tanaman ini berumah dua dan kalaupun ada sifatnya steril. Sedangkan umbinya mulai terbentuk setelah tanaman berumur lima tahun, umbi tua mengalami masa dormansi selama tiga bulan. Teknik kultur jaringan telah berhasil menghasilkan bibit dalam skala besar pada beberapa jenis *Dioscorea* seperti dilaporkan oleh Chaturvedi *et al.* (1982), Ammirato (1984), dan Viana dan Mantell (1989). Teknik ini juga dapat dimanfaatkan untuk mempelajari biosintesis sampai produksi diosgenin (Kaul *et al.*, 1969; Stohs *et al.*, 1969; Segupta *et al.*, 1989; Tjondronegoro, 1991).

Perbanyakan dengan teknik kultur jaringan sangat dipengaruhi antara lain oleh jenis eksplan, komposisi medium, dan keadaan lingkungan. Eksplan buku batang sangat sering digunakan untuk pembentukan planlet. Medium tumbuh umumnya terdiri dari medium basal MS (Murashige dan Skoog, 1962) dengan variasi dan kombinasi auksin, sitokinin dan senyawa organik kompleks. Kombinasi zat pengatur tumbuh dengan casein hidrolisat dilaporkan memacu pembentukan kalus embriogenik (Osifo, 1988). Namun medium basal MS saja dapat digunakan untuk mikropropagasi *D. alata* baik dengan pra perlakuan terhadap eksplan (Mantell *et al.*, 1978) maupun tanpa perlakuan (Ammirato, 1984).

BAHAN DAN METODE

Bahan. *D. composita* diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi FMIPA IPB.

Penyiapan Medium untuk Pertumbuhan. Medium kultur yang disiapkan ialah medium kultur buku batang, medium kultur biji, medium regenerasi, dan medium perakaran yang dipadatkan dengan agar 0.8% dan diatur pH nya menjadi 5.8. Medium kultur buku batang merupakan beberapa kombinasi medium basal MS dengan air kelapa (0, 75, dan 150 ml/l) dan 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, dan 3.0 mg/l) atau NAA (0, 0.5, dan 1.0) dan BAP (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, dan 3.0). Medium kultur biji muda merupakan beberapa medium basal MS dengan NAA (1.0, 3.0, dan 5.0 mg/l) dan BAP (0.1 mg/l). Sedangkan medium regenerasi merupakan medium basal MS dengan sukrosa (45 g/l) dan 2,4-D (0.5 mg/l) yang dikenal sebagai MS 45 (Viana dan Mantell, 1989). Medium ini digunakan sebagai medium regenerasi dari kalus yang diperoleh dari buku batang dan biji muda. Medium perakaran merupakan medium basal MS yang diperkaya dengan 0.1 mg/l NAA (Chaturvedi, 1975).

Pemilihan Eksplan. Eksplan buku batang diambil dari buku batang ke-2 sampai 5 dari bagian apikal tanaman. Setiap buku batang kemudian dipotong sepanjang 1.5 sampai 2.0 cm dan dicuci berturut-turut dengan detergen, etanol 70% selama 30 detik, Clorox 20% dan 10% (bahan aktif sodium hipoklorit 5.25%) masing-masing selama 10 menit serta $HgCl_2$ 0.1% selama 5 menit. Eksplan kemudian dibilas dengan akuades steril tiga kali sebelum ditanam pada medium kultur buku batang.

Biji muda (1-2 minggu setelah penyerbukan) disterilkan dengan merendamnya berturut-turut dalam Clorox 10% dan 5% masing-masing selama lima menit, selanjutnya dicuci akuades steril tiga kali. Biji tersebut dilukai salah satu sisinya dengan ujung skalpel, kemudian ditaruh pada medium kultur biji.

Buku batang dan biji muda ditanam pada beberapa macam perlakuan medium dengan sepuluh ulangan dan diinkubasikan dalam ruangan dengan penyinaran 1000 lux (16 jam/hari) pada suhu 25 ± 2°C.

Pengamatan. Pengamatan meliputi segala perubahan pada eksplan di dalam kultur yaitu pembentukan dan pertumbuhan kalus, tunas, akar, dan planlet. Kalus yang terbentuk ditumbuhkan pada medium MS 45 dan tunas

*Penulis untuk Korespondensi

yang terbentuk dipindahkan pada MS yang diperkaya dengan 0.1 mg/l NAA. Masing-masing diamati kemampuannya untuk beregenerasi dan berakar.

HASIL

Pengaruh Air Kelapa dan 2,4-D. Eksplan buku batang yang ditumbuhkan pada medium menunjukkan bahwa hampir semua perlakuan medium MS dengan kombinasi air kelapa (0, 75, dan 150 ml/l) dan 2,4-D (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, dan 3.0 mg/l) dapat menghasilkan kalus (Tabel 1). Medium MS dengan air kelapa 150 ml/l yang dikombinasikan dengan semua konsentrasi 2,4-D paling baik untuk pembentukan kalus. Kalus ini tumbuh banyak sekali dengan ukuran besar (diameter antara 3.9-5.0 cm). Jenis kalusnya nonembriogenik dengan tekstur lembek-berair dan pada permukaannya terdapat sedikit kalus *friable*. Perlakuan yang diberikan ini tidak cocok untuk menginduksi kalus organogenik dan embriogenik. Data lengkap hasil penelitian ini ada pada penulis (Nurwahyuni dan Tjondronegoro, 1993).

Tabel 1. Pengaruh Air Kelapa dan 2,4-D dalam Medium MS terhadap Pembentukan Kalus pada Kultur Buku Batang *D. composita*

Air kelapa (ml/l)	2,4-D (mg/l) 0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	-	k	-	k	-	-	-
75	-	k	k	k	k	k	-
150	-	k	k	k	k	k	k

k: kalus, -: eksplan tidak tumbuh

Pengaruh BAP dan NAA. Percobaan medium MS dengan kombinasi sitokinin BAP dan NAA lebih bervariasi (Tabel 2). Pada beberapa perlakuan diperoleh kalus kompak, tunas, akar, kalus dan tunas serta planlet. Tunas tunggal terbentuk dari pertumbuhan tunas aksiler.

Tabel 2. Respons Eksplan Buku Batang *D. composita* terhadap NAA dan BAP dalam Medium MS

NAA (mg/l)	BAP (mg/l) 0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
0	-	-	t	t	-	-	-
0.5	-	k	t + a	t + a	t	t	t
1.0	-	-	a	k	k	k + t	k + t

k: kalus, t: tunas, a: akar

Pada tunas yang mulai berdaun dilakukan pemeliharaan sampai daunnya hijau dan membuka. Tunas yang mempunyai 3-4 buku batang dipindahkan ke medium perakaran sampai terbentuk planlet. Eksplan buku batang yang frekuensi tumbuhnya tinggi untuk berkembang dalam kultur adalah yang berasal dari buku ke-3 dan 4.

Eksplan biji muda yang dilukai dapat membentuk kalus embriogenik pada ketiga kombinasi NAA dan BAP. Nampaknya kecepatan pertumbuhan kalus berbanding langsung dengan konsentrasi NAA (Tabel 3).

Tabel 3. Pertumbuhan Eksplan Biji *D. composita* pada Medium MS Diperkaya dengan NAA dan BAP

Perlakuan NAA dan BAP (mg/l)	Pertumbuhan Kultur % Kalus	Akar	Tunas	Planlet
1.0 dan 0.1	90	-	-	-
3.0 dan 0.1	80	-	-	-
5.0 dan 0.1	80	-	-	-

Pertumbuhan pada Medium Subkultur (MS 45). Pada medium subkultur kalus dari buku batang perlakuan medium MS dengan kombinasi air kelapa dan 2,4-D serta medium MS dengan kombinasi NAA dan BAP tidak membentuk planlet. Dalam kultur MS 45 ini, kalus *friable* dari eksplan buku batang dalam medium MS yang diperkaya dengan air kelapa dan 2,4-D dapat berdiferensiasi menjadi akar serabut sedangkan dari kalus kompak yang terbentuk pada medium MS dengan kombinasi NAA dan BAP tumbuh menjadi tunas abnormal. Namun kalus dari biji nampaknya cocok untuk diregenerasikan pada medium ini sehingga dapat diperoleh 7-10 planlet per botol kultur. Planlet kemudian diaklimatisasikan dan berhasil ditumbuhkan di pot berisi campuran tanah dan pasir dengan perbandingan 1:1.

PEMBAHASAN

Ratio sitokinin dan auksin dalam medium menentukan tipe pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang ditanam (Murashige dan Skoog, 1962). Ternyata pemilihan jenis zat pengatur tumbuh dan jenis eksplan juga ikut berpengaruh. Hal ini terbukti pada eksplan buku batang yang hanya mampu tumbuh menjadi kalus pada medium MS yang diperkaya dengan air kelapa (sumber sitokinin) dan 2,4-D (Tabel 1). Zat pengatur tumbuh yang diberikan terpisah, 2,4-D, biasanya dapat menginisiasi pembentukan kalus embriogenik *D. alata*. Sedangkan, sitokinin BAP menginduksi proliferasi meristem apikalnya dan juga memacu pertumbuhan tunas aksiler (Salisbury dan Ross, 1992).

Pada kombinasi perlakuan NAA dan BAP, pemberian BAP 1.0 dan 1.5 mg/l (Tabel 2) dapat memacu pertumbuhan tunas aksiler sesuai dengan pendapat Salisbury dan Ross (1992) dan hasil dari kombinasi perlakuan yang lain bervariasi. Hal ini mungkin disebabkan karena pengaruh hormon endogen yang jumlahnya bervariasi pada eksplan yang dikulturkan. Namun, tidak ada satupun perlakuan dalam penelitian ini yang dapat memacu proses multiplikasi tunas aksiler. Ammirato (1982) mendapatkan enam tunas per eksplan, sedangkan dari hasil percobaan ini hanya dihasilkan satu tunas saja.

Percobaan induksi kalus dan regenerasi pada *D. composita* ini menunjukkan hasil yang bervariasi. Kombinasi zat pengatur tumbuh yang diberikan hanya mampu menumbuhkan eksplan buku batang menjadi kalus nonembriogenik, akar, dan tunas tunggal. Perlakuan kombinasi NAA dan BAP hanya mampu menghasilkan satu tanaman per buku batang, sedangkan perlakuan air kelapa dan 2,4-D tidak menghasilkan planlet. Kultur biji dapat membentuk kalus embriogenik pada medium yang dicobakan dan kalus tersebut sangat responsif untuk tumbuh menjadi beberapa planlet pada medium regenerasi.

DAFTAR PUSTAKA

Ammirato, P.V. 1982. Growth and Morphogenesis in Cultures of the Monocot Yams, *Dioscorea*, p. 169-170. *In* A. Fugiwara (ed.), *Plant Tissue Culture*, Tokyo: Maruzen.

Ammirato, P.V. 1984. Yams, p. 327-354. *In* P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, and Y. Yamada. (ed.), *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 3. New York: Macmillan.

Ayensu, E.S., 1972. *Anatomy of Monocotyledons. VI. Dioscoreales*. New York: Oxford.

Chaturvedi, M.C. 1975. Propagation of *D. floribunda* from *in vitro* Culture of Single Node Stem Segments. *Curr. Sci*. **44**:839-841.

Chaturvedi, M.C, A.K. Sharna, M. Sharna, and R.N. Prasad. 1982. Morphogenesis, Micropropagation, and Germplasm Preservation of Economic Plants by Tissue Culture. p. 687-688. *In* A. Fugiwara (ed.), *Plant Tissue Culture*. Tokyo: Maruzen.

Coursey, D.G. 1967. *Yams*. London: Longmans, Green and Co.

Kaul, B., S.J. Stohs, and E.J. Staba. 1969. DioscoreaTissue Culture: III. Influence of Various Factors on Diosgenin Production by *Dioscorea deltoida* and Suspension Cultures. *Loydia* 32(3):147-159.

Mantell, S.H., S.Q. Haque, and A.P. Whitehall. 1978. Clonal Multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea roundata* Poir. Yams by Tissue Culture. *J. Hort. Sci*.53:95-98.

Murashige, S. and F. Skoog. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant*. **15**:473-496.

Nurwahyuni, N. dan P.D. Tjondronegoro. 1993. Induksi Kalus dan Regenerasi Tanaman *Dioscorea composita* Hemsl. Bogor: Lembaga Penelitian IPB (tidak dipublikasikan).

Osifo, E.O. 1988. Somatic Embryogenesis in Dios-corea. *J. Plant Physiol*. 133(3):378-380.

Salisbury, F. and C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology*. 4th ed. Belmont, California: Wadsworth Publishing Co.

Segupta, J., G.C. Mitra, and A.K. Sharna. 1989. Steroid Formation During Morphogenesis in Callus Cultures of *Dioscorea floribunda*. *J. Plant Physiol*. 135(1):27-30.

Sudiarto, F. Chairiani, S.M. Rosita, dan P. Wahid. 1985. Perkembangan Penelitian Budidaya Tanaman Bahan Baku Pil Kontrasepsi. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 4(3):71-76.

Stohs, J.S., B.G. Karel, and E.J. Staba. 1969. The Metabolism of 14 C-Cholesterol. *Phytochem*. **8**:1679-1686.

Tjondronegoro, P.D. 1991. Pembentukan Diosgenin pada Kultur Kalus *Dioscorea bulbifera* L. Disertasi. Bogor: Fakultas Pasca Sarjana IPB (tidak dipublikasikan).

van Steenis, C.G.G.J. 1981. *Flora*. Jakarta: PT Pradnya Paramita.

Viana, A.M. and S.H. Mantell. 1989. Callus Induction and Embryos of the Seed Propagated Yams *Dioscorea composita* Hemsl and *D. cayensis* Lam. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **16**:113-122.