

Kultur tisu keladi musang (Tissue culture 'keladi musang')

Suryanti Bustam, Nur Atisha Shamsuddin, Abdul Muhaimin
Abdul Kadir, Noor Camellia Noor Alam dan Umikalsum
Mohamed Bahari

Pengenalan

Xanthosoma merupakan genus dalam tumbuhan berbunga daripada keluarga Araceae. Genus ini mempunyai kira-kira 40 spesies yang biasanya ditanam sebagai tumbuhan hiasan dan juga sebagai sumber makanan yang boleh diperolehi daripada umbisnya yang berkembang di dalam tanah (*tuber*). Genus ini berasal dari bahagian tropika negara Amerika, namun ditanam secara meluas dan telah lama beradaptasi dengan kawasan-kawasan beriklim tropika yang lain termasuk Malaysia. Selain keladi popular daripada genus *Colocasia*, keladi daripada genus *Xanthosoma* juga merupakan antara keladi yang boleh dimakan. *Xanthosoma* menghasilkan umbisi utama di dalam tanah yang dikenali sebagai *corm*. *Corm* tidak boleh dimakan dan dikelilingi oleh umbisi-umbisi yang lebih kecil seperti saiz kentang. Umbisi-umbisi kecil ini dikenali sebagai *cormels* dan bahagian inilah yang boleh dimakan. *Cormels* mempunyai kandungan sumber kanji yang tinggi dan dimakan setelah dimasak seperti kentang. Ia boleh dipanggang, digoreng dan dijadikan sebagai puri dan juga bahan tambahan di dalam sup dan juga *stew*.

Salah satu spesies bawah genus ini ialah *Xanthosoma violaceum* Schott yang dikenali sebagai Keladi Musang oleh orang tempatan. Ia merupakan antara tumbuhan berubi yang penting dan ditanam secara komersial. *X. violaceum* dianggap sebagai tanaman kanji yang berpotensi secara ekonomi kerana permintaannya di Eropah dan di Amerika Syarikat sentiasa meningkat. Kajian oleh penyelidik MARDI mendapati umbisnya boleh digunakan sebagai bahan asas dalam menghasilkan filem pembungkus makanan yang boleh dimakan bersama-sama makanan yang dibungkus. Ia berpotensi untuk menggantikan pembungkusan plastik makanan yang telah biasa digunakan dalam industri penghasilan makanan pada masa sekarang. *X. violaceum* dimakan secara kerap oleh masyarakat pedalaman di Bangladesh di mana daun dan batangnya (*aerial part*) dijadikan sebagai sayuran. Ekstrak metanol daun dan batangnya mempunyai sifat antihiperghlisemia yang boleh menurunkan aras kandungan gula dalam darah pesakit diabetes. Selain itu, ia juga mempunyai sifat *antinociceptive* yang boleh mengurangkan rasa sakit. Oleh itu, *X. violaceum* berpotensi untuk menjadi sumber alternatif selain ubat-ubat moden yang berasaskan bahan kimia untuk menurunkan aras gula dalam darah bagi pesakit diabetes dan juga untuk mengurangkan rasa sakit. Selain itu, ekstrak

polar daun *X. violaceum* menunjukkan kandungan sebatian fenolik yang tinggi terutama kandungan flavon yang berfungsi secara efisien sebagai agen antioksidan dan mempunyai sifat yang boleh merencatkan radikal bebas.

Pembiakan keladi

Keladi kebiasaannya dibiakkan secara vegetatif daripada segmen umbisi. Walau bagaimanapun, patogen mudah disebarkan melalui kaedah ini, di mana tumbuhan terdedah kepada serangan patogen seperti *Pythium myriotylum* dan boleh menyebabkan penyakit reput akar *cocoyam*. Pembiakan mikro atau pembiakan secara *in vitro* merupakan salah satu lagi kaedah pembiakan vegetatif lain yang boleh dijadikan pembiakan alternatif bagi keladi. Kaedah ini melibatkan proses penggandaan dan morfogenesis bahagian tumbuhan seperti organ, tisu dan sel dalam keadaan aseptik. Ia dikultur pada medium pertumbuhan seperti medium Murashige dan Skoog (MS) yang ditambah dengan hormon yang sesuai bagi menghasilkan klon baharu tumbuhan. Melalui teknik ini, klon berkualiti dapat dihasilkan dengan banyak dalam masa yang singkat dan seterusnya dapat meningkatkan pengeluaran tumbuhan.

Kajian terdahulu terhadap keladi lain iaitu *X. saggitifolium* (L.) Schott menunjukkan bahawa penggandaan pucuk telah berjaya dihasilkan melalui kaedah kultur tisu pada medium Murashige dan Skoog ditambah dengan pelbagai kombinasi hormon seperti asid indol butirik (IBA), asid naftalena asetik (NAA), asid 2, 4-diklorofenoksi-asetik (2, 4-D), Benzil amino purina (BAP) dan kinetin. Ujian penggandaan pucuk secara kultur tisu yang ditambah dengan hormon mendapati bahawa 5 – 20 μM BAP (Benzil amino purina) dan 1 – 4 μM TDZ (Thidiazuron) menghasilkan lebih banyak pucuk berbanding dengan tanpa hormon. Keputusan yang sama juga diperhatikan pada keladi daripada genera lain iaitu *Colocasia esculenta* di mana penambahan hormon dalam medium kultur Murashige dan Skoog menghasilkan lebih banyak anak pokok. Melihat kepada potensi *X. violaceum* yang mampu untuk menjadi sumber makanan baharu, kaedah pembiakannya secara kultur tisu telah diterokai.

Sumber eksplan dan pensterilan

Eksplan diperoleh daripada anak pokok muda *X. violaceum* yang sihat dan ditanam di tapak semaian (*Gambar 1*). Anak pokok dipotong kira-kira 4 cm panjang yang mengandungi meristem pucuk dan juga sedikit bahagian umbisi. Helaian daun luar dibuang sehingga tinggal 5 – 6 helai sahaja (*Gambar 2*). Eksplan dicuci menggunakan air paip yang mengalir selama 30 minit. Di dalam kabinet aliran udara laminar, eksplan direndam dengan larutan peluntur komersial (Clorox) dengan kepekatan 20% selama 15 minit (*Gambar 3*) dan kemudian dipotong kepada

kira-kira 1 cm sampel yang terdiri daripada meristem dan 2 mm umbisi dengan 3 – 4 helaian daun (*Gambar 4*). Eksplan seterusnya dibasmi kuman menggunakan larutan etanol dengan kepekatan 70% selama 30 saat diikuti dengan larutan Clorox dengan kepekatan 5% selama lima minit. Akhir sekali, eksplan dibilas menggunakan air suling steril sebanyak tiga kali.

Medium kultur

Di dalam kabinet aliran udara laminar, eksplan dimasukkan secara aseptik (bebas kuman) ke dalam botol kultur yang mengandungi medium agar Murashige dan Skoog separa pejal yang ditambah dengan myo-inositol (100.0 mg/L), glisin (2.0 mg/L), asid nikotik (0.5 mg/L), piridoksin HCl (0.5 mg/L), thiamina HCl (0.1 mg/L), ferrous sulfat (27.8 mg/L), Na₂ EDTA (37.3 mg/L), sukrosa (40 g/L) dan gelrite (4 g/L). Medium diubah suai kepada pH 5.7 – 5.8 dengan menggunakan larutan 0.1 M NaOH (natrium hidroksida) atau 0.1 M HCl (asid hidroklorik). Medium dituang ke dalam bekas (botol/tiub) kultur dan kemudiannya disteril menggunakan mesin autoklaf pada 121 °C dan 15 p.s.i selama 15 minit. Seterusnya, medium disejukkan dan disimpan pada suhu bilik yang dingin dalam keadaan gelap sebelum digunakan.

Penggandaan anak pokok in vitro

Pucuk in vitro mula tumbuh dan menghasilkan daun pertama selepas 10 – 20 hari dalam medium kultur (*Gambar 5*). Pucuk in vitro ini dibiarkan membesar selama dua bulan sehingga menghasilkan anak pokok lengkap berukuran 10 – 15 cm dengan 3 – 5 helai daun (*Gambar 6*) dan digunakan sebagai sampel pemula untuk menggandakan anak-anak pokok yang baharu secara kultur tisu. Anak pokok in vitro ini dipotong untuk mendapatkan 1 cm eksplan yang mengandungi meristem pucuk bersama-sama dengan 2 mm bahagian umbisi (*Gambar 7*). Eksplan dibelah dua secara menegak menjadi separuh dan kemudian ditumbuhkan secara aseptik di dalam botol kultur yang mengandungi medium agar Murashige dan Skoog (MS) separa pejal yang ditambah hormon bagi menggalakkan pertumbuhan pucuk iaitu 10 – 20 µM Benzil amino purina (BAP) dan 5 – 20 µM Thidiazuron (TDZ). Selepas satu bulan proses penggandaan, sebanyak lima anak pokok baharu akan terhasil daripada satu eksplan yang dikultur dalam medium penggandaan (*Gambar 8* dan *Rajah 1*).

Regenerasi anak-anak pucuk

Anak-anak pokok baharu yang terhasil semasa proses penggandaan diasingkan dan dipindahkan satu persatu ke dalam tiub kultur yang berisi medium agar asas Murashige dan Skoog separa pejal bagi membentuk anak pokok sihat yang lengkap dengan daun dan akar. Anak pokok lengkap berukuran 7 – 13 cm terhasil selepas dua bulan proses regenerasi (*Gambar 9*).



Gambar 1. Anak pokok diambil daripada pokok induk yang ditanam di tapak semaian



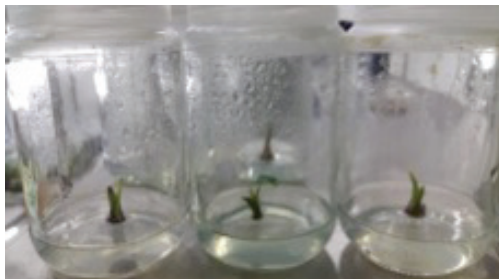
Gambar 2. Eksplan mengandungi meristem pucuk dipotong daripada anak pokok



Gambar 3. Pensterilan eksplan menggunakan larutan Clorox



Gambar 4. Eksplan dipotong kepada 1 cm secara aseptik di dalam kabinet aliran udara laminar



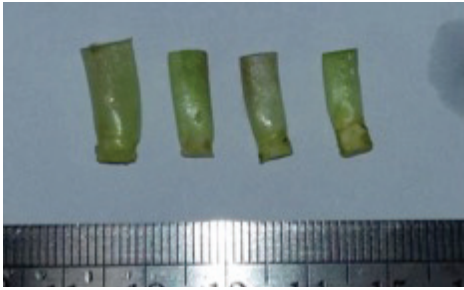
Gambar 5. Pucuk *in vitro* yang tumbuh daripada eksplan selepas 10 – 20 hari di dalam medium kultur



Gambar 6. Anak pokok *in vitro* selepas dua bulan di dalam medium kultur

Aklimatisasi anak pokok

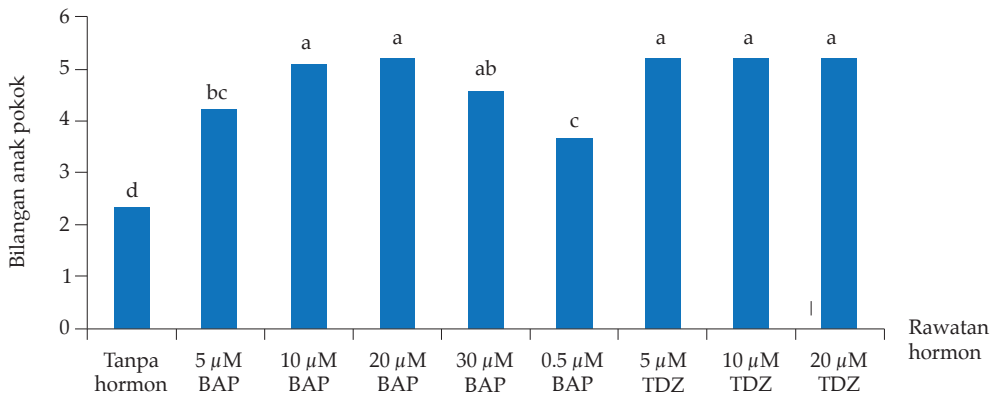
Selepas lapan minggu proses regenerasi *in vitro*, anak-anak pokok boleh dipindahkan dan ditumbuhkan di persekitaran luar. Proses ini dikenali sebagai aklimatisasi. Anak-anak pokok berukuran 10 – 13 cm dipilih dan dikeluarkan daripada tiub kultur. Seterusnya, akar anak pokok perlu dibasuh dengan air paip mengalir bagi menghilangkan agar (gel) yang melekat pada pokok. Anak-anak pokok diletakkan ke dalam kotak plastik yang berisi air separuh penuh dalam keadaan akar terendam di dalam air dan dibiarkan semalaman (Gambar 10). Pada keesokannya, anak pokok ditanam dalam medium pertumbuhan komersial yang dibeli dipasaran dan komponen di dalam medium tidak didedahkan pada label/bungkusan yang diisi di dalam polibeg kecil. Polibeg-polibeg berisi anak pokok disusun di dalam kotak



Gambar 7. Eksplan yang mengandungi meristem pucuk bersama-sama dengan bahagian umbisi



Gambar 8. Penghasilan lima anak pokok baharu daripada satu eksplan yang dikultur dalam medium pengandaan Murashige dan Skoog separa pejal dibekalkan dengan hormon BAP



Rajah 1. Bilangan anak pokok *X. violaceum* yang terhasil selepas empat minggu dikultur pada medium Murashige dan Skoog yang ditambah hormon BAP dan TDZ pada kepekatan yang berbeza *Min dengan abjad yang berlainan adalah berbeza secara signifikan pada $p \leq 0.05$



Gambar 9. Anak pokok lengkap *X. violaceum* selepas dua bulan proses regenerasi



Gambar 10. Anak-anak pokok dibiarkan semalaman dengan akarnya yang terendam di dalam air



Gambar 11. Anak pokok yang hidup di persekitaran luar selepas empat minggu proses aklimatisasi

plastik dan disiram. Kotak plastik diisi air separuh penuh bagi mengekalkan tahap kelembapan medium tanaman. Kotak plastik berisi anak pokok ditutup dengan plastik lut sinar selama dua minggu untuk mengelakkan kehilangan air dengan cepat. Anak pokok disimpan di tempat lindungan matahari bagi mengelakkan berlakunya kejutan haba oleh pancaran cahaya matahari terus. Anak pokok didedahkan dengan cahaya matahari secara berperingkat selepas dua minggu (Gambar 11) sebelum didedahkan pada cahaya matahari

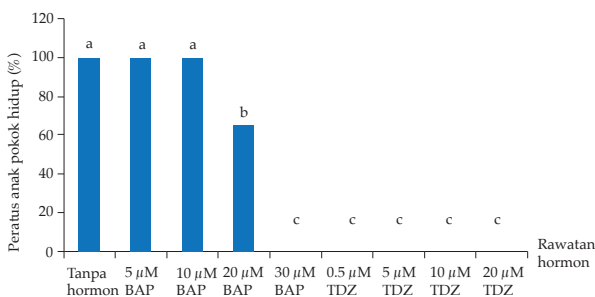
penuh pada minggu keempat. Anak pokok disiram hanya apabila permukaan atas medium pertumbuhan mula mengering. Anak pokok dengan rawatan tanpa hormon, 5 dan 10 μM BAP sahaja yang mencatatkan peratusan penuh bagi kebolehan untuk hidup selepas empat minggu proses aklimatisasi (Rajah 2).

Penanaman di batas

Setelah sekurang-kurangnya empat minggu proses aklimatisasi, anak pokok sedia untuk ditanam di atas batas. Kebanyakan anak pokok mampu untuk terus hidup setelah dua bulan ditanam di batas (Gambar 12).

Kesimpulan

X. violaceum boleh dibiakkan melalui kaedah kultur tisu. Melalui kaedah ini, lima anak pokok dapat dihasilkan daripada satu eksplan meristem pucuk apabila menggunakan medium Murashige dan Skoog yang dibekalkan dengan hormon 10 – 20 μM BAP atau 5 – 20 μM TDZ. Walau bagaimanapun, anak pokok yang akan digunakan terus untuk proses aklimatisasi selepas proses penggandaan, adalah disarankan untuk menggunakan hormon 5 – 10 μM BAP kerana menghasilkan 100% kebolehan untuk terus hidup semasa proses aklimatisasi daripada kultur



Rajah 2. Peratus anak pokok yang hidup selepas empat minggu proses aklimatisasi anak pokok yang telah dirawat dengan hormon yang berbeza. Min dengan abjad yang berlainan adalah berbeza secara signifikan pada $p \leq 0.05$



Gambar 12. Anak pokok yang berusia dua bulan selepas ditanam di batas

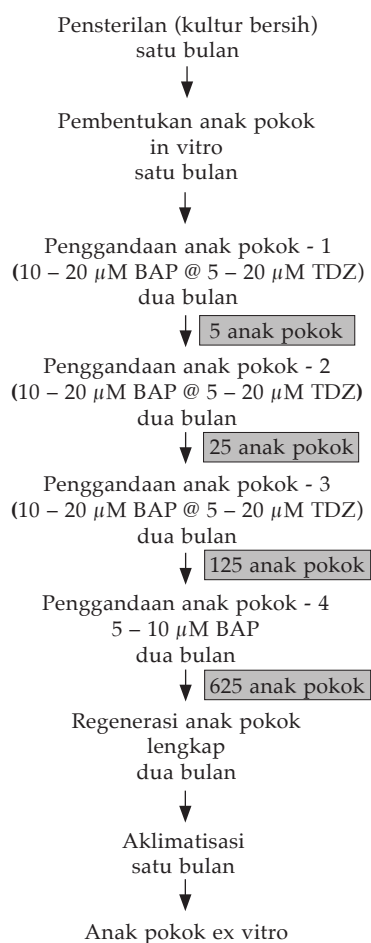
tisu ke persekitaran luar. Proses penggandaan ini mengambil masa kira-kira enam bulan daripada mendapatkan kultur bersih/steril sehingga anak pokok bersedia untuk melalui proses aklimatisasi (*Carta alir 1*). Anak-anak pokok ini boleh ditanam terus ke batas selepas melalui proses aklimatisasi ataupun digunakan sebagai bahan untuk menggandakan semula anak pokok untuk kali kedua dan seterusnya. Dijangkakan melalui teknik kultur tisul daripada satu pucuk *X. violaceum* yang melalui empat kali proses penggandaan, sebanyak 625 anak pokok sedia untuk diaklimatisasi akan dihasilkan dalam tempoh setahun.

Penghargaan

Kajian ini dapat dilaksanakan dengan sumbangan dan sokongan kewangan dari Institut Penyelidikan dan Kemajuan Pertanian Malaysia (MARDI) bawah Projek Rancangan Malaysia Ke-11 (RMK-11). Penghargaan ditujukan kepada ketua projek dan ketua subprojek iaitu Dr. Rozlaili Zainol, Puan Erny Sabrina Mohd Noor dan Puan Umi Kalsum Mohamed Bahari kerana melibatkan kajian ini dalam projek yang bertajuk "Bioprospeksi dan Domestikasi Sayuran Tradisional Terpilih yang Berkualiti dan Bernilai Komersial". Terima kasih juga diucapkan kepada Cik Aida Shahiera Khasnun atas bantuan teknikal yang diberikan.

Bibliografi

- Bailey L.H., (1996). *Manual on Cultivated Plants*. New York, USA, The Mac Millan Company
- Mohd. Norfaizal, G., Mohd. Shukri, M.A., Erny Sabrina, M.N., Mohd. Zulkhairi, A., Latiff, A. Noor Zainah A., Salmaniza, S. dan Masrom, H. (2016). *Colocasia, Xanthosoma* and conservation of Malaysia's edible aroid genetic resources. *Utara Agriculture Science Journal* Vol. 2 No. 3
- Ivancic, A. dan Lebot, V., (1999). *Botany and genetics of new caledonian wild taro, Colocasia esculenta*. *Pacific Science* (University of Hawaii) 53(3): 273 – 285
- Gupta, P.P. (1985). Plant regeneration and variabilities from tissue culture of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* and *X. violaceum*). *Plant Cell Reports*. Volume 4, Issue 2: 88 – 91
- ReyesCastro, G., Nyman, M. dan Rönnberg-Wästljung, A.C. (2005). Agronomic performance of three cocoyam (*Xanthosoma violaceum* Schott) genotypes grown in Nicaragua. *Euphytica* 142: 265 – 272
- Noor Zainah, A., Nor Azmah, U., Khairul, A. H., Nadia, A., Adawiyah, A., Muhammad Ramdhan, A.B., Mohammad Shafeq dan Siti Suhaiza,. (2016). A comparative study of edible film properties developed from cocoyam (*Xanthosoma Violaceum*) and taro (*Colocasia esculenta*) starches. *Proceeding SEAVEG*



Carta alir 1. Protokol penggandaan anak pokok kultur tisul X. violaceum daripada satu eksplan dalam tempoh setahun

- Faisal, M., Hossain, A.I., Rahman, S., Jahan, R. dan Rahmatullah, M. (2014). A preliminary report on oral glucose tolerance and antinociceptive activity tests conducted with methanol extract of *Xanthosoma violaceum* aerial parts. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, 14: 335
- Picerno, P., Mencherini, T., Lauro, M.R., Barbato, F. dan Aquino, R. (2003). Phenolic constituents and antioxidant properties of *Xanthosoma violaceum* Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 6423 – 6428
- Pacumbaba, R.P., Wutoh, J.G., Sama, A.E., Tambong, J.T. dan Nyochembeng, L.M. (1992). Isolation and pathogenicity of rhizosphere fungi of cocoyam in relation to the cocoyam root rot disease. *Journal of Phytopathology* Vol. 135: 265 – 273
- Debergh, P.C. dan Read, P.E. (1991). *Micropropagation in Micropropagation, Technology and Application*, (Debergh, P.C. dan Zimmerman, R.H., ed.), m.s. 1 – 13, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Arditti, J. dan Ernst, R. (1993). *Micropropagation of Orchid*. New York, USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Saiprasad, G.V.S dan Polisetty, R. (2003). Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*. 39: 42 – 48
- Seeni, S. dan Latha, P.G. (1992). Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renantera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 29: 167 – 172
- Omokolo, N.D., Tsala, N.G., Kanmegne, G. dan Balange, A.P. (1995). Production of multiple shoots, callus, plant regeneration and tuberization in *Xanthosoma sagittifolium* cultured in vitro. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, vol. 318, m.s. 773 – 778.
- Yam, T.W., Hsu, G.I. dan Arditti, J. (1990). Plant regeneration *in vitro* of South Pacific taro *Colocasia esculenta* var. *esculenta* cv. Akalomamale, Aracea. *Plant Cell Reports*, Vol. 9, Issue 4, m.s. 229 – 232
- Sama, A.E., Hughes, H.G., Abbas, M.S. dan Shahba, M.A. (2012). An efficient *in vitro* propagation protocol of cocoyam [*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. *The Scientific World Journal*, Volume 2012
- Uphof, J.C.T (1959). *Dictionary of Economic Plants*. Weinheim Publication

Ringkasan

Xanthosoma violaceum Schott dianggap sebagai tanaman kanji yang berpotensi untuk ekonomi kerana daun yang mempunyai sifat antioksidan/merencatkan radikal bebas. Bahagian 'aerial' (daun dan batang) mempunyai ciri-ciri antihiperghlisemia yang boleh menurunkan aras kandungan gula dalam darah pesakit diabetes. Selain itu, ia juga mempunyai sifat *antinociceptive* untuk mengurangkan rasa sakit. Kajian ini dijalankan untuk mengenal pasti potensi teknik kultur tisu *in vitro* sebagai kaedah pembiakan alternatif untuk spesies ini. Pucuk *in vitro* *X. violaceum* yang steril/bersih telah terhasil selepas satu bulan dalam medium semisolid Murashige dan Skoog (MS) asas daripada 1 cm eksplan yang mengandungi meristem pucuk yang diperolehi daripada anak pokok muda dari tapak semaian. Pucuk *in vitro* ini membentuk anak pokok dan dijadikan sebagai sumber eksplan untuk menghasilkan lebih banyak anak pokok menggunakan medium MS semisolid ditambah dengan Benzil amino purina (BAP) dan Thidiazuron (TDZ). Kajian ini mencadangkan bahawa tahap hormon optimum yang boleh digunakan untuk penggandaan anak pokok ialah 10 – 20 μ M BAP atau 5 – 20 μ M TDZ yang menghasilkan lima anak pokok selepas empat minggu tempoh kultur. Walau bagaimanapun, untuk anak pokok yang

akan digunakan terus untuk proses aklimatisasi selepas penggandaan, disarankan untuk menggunakan 5 – 10 μM BAP kerana ia menghasilkan 100% kebolehan untuk terus hidup semasa aklimatisasi.

Summary

Xanthosoma violaceum Schott is considered as an economic potential starch crop as the leaves have antioxidant/free radical scavenging properties. The aerial part has antihyperglycemic properties which can lower blood sugar in diabetic patients and also antinociceptive properties for alleviating pain. This study was carried out to identify the potential of in vitro tissue culture technique as an alternative method of propagating this species. Sterile/clean in vitro shoot of *X. violaceum* was initiated after one month in semisolid basal Murashige and Skoog (MS) medium from the 1 cm explant containing shoot apical meristem derived from young seedling from the nursery. This in vitro shoots developed into plantlets and were used as explants to produce more multiple shoot using semi solid MS medium supplemented with Benzyl amino purine (BAP) and Thidiazuron (TDZ). This study suggested that the optimum hormone level that can be used for shoot multiplication is between 10 – 20 μM BAP or 5 – 20 μM TDZ where it resulted in approximately five shoots after four weeks of culture. However, for seedling that will be used directly for acclimatization after multiplication, it is suggested to use 5 – 10 μM BAP as it resulted in 100% survival during acclimatization.

Pengarang

Suryanti Bustam

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

E-mel: suryanti@mardi.gov.my

Nur Atisha Shamsuddin

Pusat Penyelidikan Agrobiodiversiti dan Persekitaran

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

Abdul Muhaimin Abdul Kadir, Noor Camellia Noor Alam dan

Umikalsum Mohamed Bahari

Pusat Penyelidikan Tanaman Industri

Ibu Pejabat MARDI, Persiaran MARDI-UPM, 43400 Serdang, Selangor

