

Induksi Kalus Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Pada Media MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa

Sri Niken Ariati^{1*}, Waeniati², Muslimin², I Nengah Suwastika¹

¹Lab.Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tadulako. Palu, Sulawesi Tengah

²Lab.Kultur Jaringan, Fakultas Kehutanan, Universitas Tadulako. Palu, Sulawesi Tengah

ABSTRACT

Study on callus induction of cacao (*Theobroma cacao* L.) was conducted at the Tissue Culture laboratory, Forestry faculty, Tadulako University, Palu, during periode of January until April 2012. This research was aimed to obtain the best medium formulation for induction and growth of cacao callus. Calli was induced from embryo on MS based medium containing of 2,4-D, BAP and coconut water. The intact plant as explant was taken from Local Farming. This experiment was arranged in completely randomized design with 4 treatments and 3 replications. The treatments were : MS medium + 2 ppm 2,4-D + 15% coconut water (N1), MS medium + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP, 15% coconut water (N2), MS medium + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP (N3), and MS medium + 2 ppm 2,4-D (N4). Parameters observed in this study were the days appear of callus, percentage of explant producing callus (%), also observation on morphology and the cell of callus. The best medium for callus induction was MS medium + 2 ppm 2,4-D + 15% coconut water (N1). This medium produces healthy-compac callus which active in cell proliferation, in 6 days after induction.

Keywords: 2,4-D, BAP, Callus, Coconut water, *Theobroma cacao* L.

ABSTRAK

Penelitian tentang induksi kalus pada tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) telah dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Kehutanan Untad, Palu pada bulan Januari - Mei 2012. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan formulasi media kultur in vitro yang terbaik dalam menginduksi kalus tanaman kakao. Kalus diinduksi dari eksplan embrio kakao menggunakan media dasar MS dengan penambahan 2,4-D, BAP dan Air kelapa. Eksplan yang digunakan diperoleh dari tanaman induk kakao dari perkebunan rakyat. Penelitian ini disusun dalam Rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Perlakuan yang dicobakan yaitu : medium MS + 2 ppm 2,4-D + 15% Air Kelapa (N1), medium MS + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP + 15% Air Kelapa (N2), medium MS + 2 ppm 2,4-D, 0,2 ppm BAP (N3) dan medium MS + 2 ppm 2,4-D (N4). Parameter yang diamati adalah saat munculnya kalus, persentasi eksplan yang menghasilkan kalus, serta morfologi dan pengamatan sel kalus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa formulasi medium MS + 2 ppm 2,4-D, 15% Air Kelapa (N1) merupakan media terbaik untuk menginduksi kalus yang ditandai dengan munculnya kalus yang kompak dan aktif membelah mulai 6 hari setelah tanam.

Kata Kunci : 2,4-D, BAP, Air Kelapa, Kalus, *Theobroma cacao* L.

* Corresponding Author phone (+6285259252547)
e-mail : niken_to@rocketmail.com

PENDAHULUAN

Theobroma cacao L., atau yang lebih dikenal dengan tanaman kakao, merupakan tumbuhan tropis yang berasal dari Amerika Latin yang dapat tumbuh hingga mencapai 10 meter (Argout *et al.*, (2011), Winarsih (2002)). *T.cacao* telah dikenal di Indonesia sejak tahun 1560. Negara Indonesia merupakan penghasil kakao terbesar ketiga setelah Ghana dan Pantai Gading. Selain itu, di Indonesia komoditas kakao merupakan komoditas penghasil devisa negara nomor tiga setelah kelapa sawit dan karet. Berdasarkan data ICCO (*International Cacao Organization*) komoditas kakao di Indonesia pada tahun 2009 total pendapatannya dapat mencapai sebesar US \$ 1,8 milyar atau naik 20% dari tahun sebelumnya (Jauhari dan Wirjodirdjo, 2010).

T.cacao memiliki banyak manfaat, tidak hanya sebagai komoditas penghasil devisa negara tetapi biji cacao juga merupakan satu-satunya bahan utama dalam pembuatan coklat. Selain itu kakao pun banyak digunakan sebagai bahan utama dalam beberapa produk kosmetik, industri farmasi dan lain sebagainya. Meskipun demikian, Agrobisnis kakao di Indonesia masih menghadapi berbagai masalah kompleks antara lain produktivitas kebun masih rendah akibat serangan hama penggerek buah kakao (PBK), mutu produk dan jumlah masih rendah serta masih belum optimalnya pengembangan produk kakao serta penyediaan jumlah bibit kakao yang unggul. Hal ini menjadi suatu tantangan untuk menyelesaikan masalah yang dihadapi oleh perkebunan kakao sekaligus sebagai peluang untuk mengembangkan usaha dan meraih nilai tambah yang lebih besar dari agribisnis kakao (Silva *et al.*, 2009., Argout *et al.*, 2011., Veco, 2011).

Salah satu alternatif untuk mengatasi masalah yang dihadapi oleh perkebunan kakao melalui rekayasa genetika. Keuntungan dari rekayasa genetika dalam perbaikan tanaman genetik telah menyebabkan pengembangan metode transformasi DNA, dimana diharapkan dapat memecahkan masalah dalam meningkatkan produktivitas suatu tanaman (Figueira *et al.*, 1991, Chantrapradist dan Kanchanapoom, 1995., Chaidamsari *et al.*, 1999, Purnamaningsi, 2002, Silva *et al.*, 2009, Tsai and Kinsella, 1981.).

Menurut Winarsih *et al.*, (2002) Salah satu cara yang paling efektif untuk mengendalikan hama PBK dan penyakit pada kakao serta menghasilkan bibit unggul dapat melalui teknik kultur jaringan yaitu induksi kalus dan rekayasa genetika

Sejauh ini kultur sel kakao sebagai model sel untuk penelitian kakao belum tersedia. Karena selama ini sebagian besar peneliti menggunakan sel kultur Arabidopsis dan sel tembakau BY2 sebagai model sel. Menurut Argout *et al.*, (2008), berdasarkan filogenetik tumbuhan

cacao dan Arabidopsis berbeda. Ada beberapa gen yang tidak ditemukan pada tumbuhan Arabidopsis, dan mungkin sangat penting dalam perkembangan tumbuhan kakao selanjutnya. Oleh karena itu, diperlukan adanya bentuk sel kakao hasil kultur jaringan yang nantinya akan digunakan sebagai model sel dalam penelitian berbagai aspek molekuler dan seluler tumbuhan kakao. Selain itu, salah satu manfaat kultur kalus adalah untuk mendapatkan produk yang berupa kalus dari suatu eksplan yang dapat ditumbuhkan secara terus-menerus sehingga dapat dimanfaatkan dalam mempelajari metabolisme dan diferensiasi sel, morfogenesis sel, variasi somaklonal, transformasi genetik serta produksi metabolit sekunder juga merupakan beberapa manfaat dari hasil kultur kalus. Selain itu menurut Tsai dan Kinsella (1981), induksi embrio dari kultur sel kakao sangat berpotensi dalam menghasilkan lipid yang khas melalui kultur jaringan secara *in vitro*.

Di Indonesia, telah lama dikembangkan teknik kultur jaringan tanaman kakao kurang lebih selama satu dasawarsa dengan menggunakan beberapa organ dari cacao itu sendiri yang dijadikan sebagai eksplan. Namun, hasilnya masih belum memuaskan (Chaidamsari *et al.*, 1999). Informasi tentang studi terhadap induksi kalus kakao masih belum cukup. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk memperoleh formulasi media yang terbaik untuk induksi dan pertumbuhan kalus kakao. Adapun manfaat dari penelitian ini yaitu Dapat digunakan sebagai dasar ilmiah dalam perkembangbiakan secara *in vitro* tanaman kakao khususnya dalam tahap induksi dan perkembangan kalus. Dalam penelitian ini juga dilaporkan bentuk dari sel kakao itu sendiri.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Kehutanan. Universitas Tadulako, Palu dari bulan Januari Sampai April 2012. Universitas Tadulako. Sulawesi Tengah. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah embrio buah kakao. Penelitian ini diatur dalam rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 3 ulangan. sehingga ditemukan 12 unit percobaan. Perlakuan yang dicobakan meliputi :

N1 = Medium MS + 2 ppm 2,4-D + 15% Air kelapa

N2 = Medium MS + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP + 15% Air kelapa

N3 = Medium MS + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP

N4 = Medium MS + 2 ppm 2,4-D

Parameter pengamatannya terdiri dari :

a) Saat munculnya kalus

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati perkembangan eksplan yang mulai penanaman hingga terbentuknya kalus. Pengamatan bertujuan untuk mengetahui kecepatan eksplan berkalus pada tiap-tiap perlakuan.

b) Morfologi Kalus

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati secara visual bagian morfologi kalus yaitu melihat butiran-butiran kalus, warna kalus, struktur kalus yang terbentuk. Pengamatan dilakukan sejak munculnya kalus selama 1-2 minggu setelah pertumbuhan kalus.

c) Pengamatan sel kalus

Pengamatan dilakukan dengan mengamati sel kalus dibawah mikroskop. Hal ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana bentuk sel kalus yang dihasilkan. Pengamatan dilakukan diakhir pengamatan dengan menggunakan mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus kakao dapat diinduksi pada semua medium perlakuan. Kalus kakao terbentuk pada permukaan eksplan dan luka irisan yang ditandai dengan pembengkakan pada eksplan dan berwarna putih. Menurut George (1993) kalus dapat diinisiasi secara in vitro dengan meletakkan irisan jaringan tanaman (eksplan) pada media tumbuh dalam kondisi steril. Dengan adanya luka irisan 2,4-D lebih muda berdifusi ke dalam jaringan tanaman, sehingga 2,4-D yang diberikan akan membantu auksin endogen untuk menstimulasi atau merangsang pembelahan sel, terutama sel-sel di sekitar area luka (Ulfa, 2011).

Saat munculnya kalus dihitung berdasarkan kecepatan eksplan menunjukkan tanda-tanda membentuk kalus setelah kultur. Respon pertumbuhan kalus tercepat pada media N1 yaitu sekitar 6-7 hari setelah kultur. Sedangkan, eksplan yang memberikan respon paling lambat adalah eksplan pada medium N3 yaitu 21 setelah tanam (Gambar 1).

Menurut Gati dan Mariska (1992), 2,4-D efektif untuk merangsang pembentukan kalus karena aktivitas yang kuat untuk memacu proses diferensiasi sel, organogenesis dan menjaga pertumbuhan kalus. Selain itu, studi tentang pengaruh asam 2,4-D terhadap pembentukan kalus dan pertumbuhan *Acalypha indica* L. menunjukkan bahwa kehadiran BAP di media juga mendukung pembentukan kalus (Rahayu *et al.*, 2002). Selain itu, adanya perbedaan hasil dalam pembentukan kalus dari setiap medium perlakuan juga dipengaruhi adanya air kelapa dalam medium. Medium yang ditambahkan dengan air kelapa akan menghasilkan kalus yang sangat cepat sedangkan medium tanpa air kelapa akan menghasilkan kalus yang sangat lama (Gambar 1). Hasil penelitian ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurwahyuni

dan Puspa, (1994) dengan menggunakan tumbuhan *Dioscorea compisita* dengan menggunakan air kelapa dan 2,4-D.

Penambahan air kelapa pada inisiasi kalus di media sangat berpengaruh pada saat munculnya kalus (Nadar dan Heinz (1977), Seswita (2010)). Selain itu menurut Surachman (2011), komponen-komponen yang terkandung di dalam air kelapa dapat berinteraksi dengan hormone endogen yang dimiliki oleh setiap eksplan sehingga mampu merangsang pembelahan sel.

Morfologi kalus merupakan bentuk fisik kalus yang dihasilkan dalam setiap perlakuan yang diamati berdasarkan bentuk, warna, dan tekstur kalus. Rata-rata kalus yang dihasilkan per eksplan berwarna putih, berstruktur kompak dan remah. Berdasarkan pengamatan medium N1 dan N2 memiliki morfologi kalus berwarna putih, kompak dan remah (gambar 2, a dan b). Sementara itu, medium N3 dan N4 tidak hanya menghasilkan kalus berwarna putih, kompak dan remah akan tetapi mampu menginduksi akar (Gambar 2, c dan d).

Warna dan tekstur kalus merupakan indikasi awal dimulainya respon organogenesis. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi (Tsuero, 1998).

Eksplan yang di inisiasi pada media BAP dan 2,4-D tanpa menggunakan air kelapa, selain menghasilkan kalus juga dapat menginduksi akar. Tanpa adanya air kelapa maka memungkinkan ratio dari BAP tidak mampu bersifat sinergis dengan auksin. Pada perlakuan ini, ratio auksin yang diberikan lebih tinggi dari pada ratio dari BAP sehingga mampu menghasilkan akar. Menurut George (1993), jika rasio auksin lebih rendah daripada sitokinin maka organogenesis akan mengarah ke tunas, jika rasio auksin seimbang dengan sitokinin maka akan mengarah ke pembentukan kalus sedangkan jika rasio auksin lebih tinggi daripada sitokinin organogenesis akan cenderung mengarah ke pembentukan akar.

Pada penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Nurwahyuni dan Puspa (1994) tentang induksi kalus *Dioscorea compisita* dengan menggunakan kombinasi auksin dan sitokinin. Dalam penelitiannya menunjukkan bahwa konsentrasi auksin yang tinggi selain memacu pertumbuhan kalus juga mampu menghasilkan akar dari tanaman *D. compisita*.

Pengamatan bentuk sel-sel kalus diamati di bawah mikroskop, menggunakan larutan toluidin biru yang berfungsi dalam pewarnaan kromosom. Pertumbuhan embrio yang baik pada media ditunjukkan dengan adanya pembelahan dan penambahan ukuran sel kalus. Menurut Wiendi *et al.*, (1991) dan Purnamaningsih (2002), Kalus yang bersifat embriogenik adalah kalus yang memiliki sel berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil dan mengandung butir pati.

Pengamatan sel kalus dari eksplan *T. cacao* L. Menunjukkan adanya aktivitas pembelahan sel (Gambar 3). Sel-sel yang dihasilkan sangat aktif membelah. Jika dihubungkan dengan tekstur kalus, medium N1 dan N2 sangat baik dalam proses regenerasi berikutnya. Menurut Dodd (1993) kalus yang memiliki tekstur yang kompak umumnya memiliki ukuran sel kecil dengan sitoplasma padat, inti besar dan memiliki banyak pati gandum (karbohidrat).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa, medium yang paling bagus untuk pertumbuhan kalus *T. cacao* adalah medium N1 dan N2. Akan tetapi, pada penelitian lanjut disarankan menggunakan medium N1. Medium N1 menggunakan formulasi media berupa 2,4-D dan air kelapa sedangkan N2 menggunakan formulasi media 2,4-D, BAP dan air kelapa. air kelapa sering kali digunakan dalam kultur jaringan pengganti BAP. Selain menghemat, hasil yang diperoleh kedua medium tersebut tidak berbeda. Menurut Seswita (2010), Aplikasi sitokinin dalam perbanyak tanaman in vitro dapat berasal dari bahan kimia sintetik maupun bahan alami seperti air kelapa.

Semua formulasi medium yang dicobakan mampu mendorong pertumbuhan dan perkembangan kalus. Formulasi medium MS0 dengan penambahan 2 ppm 2,4-D dan 15 % air kelapa serta medium MS0 dengan penambahan 2 ppm 2,4-D, 0.2 ppm BAP dan 15 % air kelapa merupakan medium yang sangat efektif dalam menginduksi kalus. Hal ini didasarkan pada kecepatan dalam menginduksi kalus, sifat kalus yang kompak, berwarna putih dan sifat selnya yang terus aktif membelah.

UCAPAN TERIMAKASIH

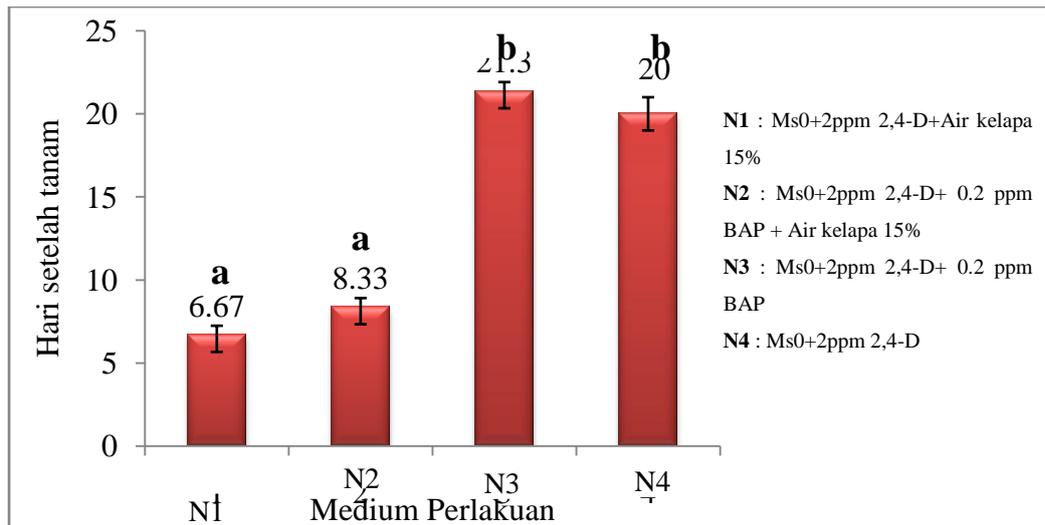
Ucapan terima kasih untuk saudari Haliana SP. atas bantuannya dalam mengelola laboratorium kultur jaringan selama penelitian dan diskusi dalam pengembangan teknik sterilisasi embrio dan induksi kalus.

DAFTAR PUSTAKA

- Argout, X., Jerome, S., Jean, M, A *et al.*, 2011. *The genome of Theobroma cacao*. Articles, Volume 43, Number 2, February 2011, Nature Genetics.
- Argout, X., Olivier, F., Patrick, W *et al.*, 2008. *Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of Theobroma cacao L. generated from various tissues and under various conditions*. BMC Genomics 2008, 9:512.
- Chantrapradist, C and K, Kanchanapoom, 1995., *Somatic Embryo Formation From Cotyledonary Culture Of Theobroma cacao L.* J.Sci.Soc.Thailand, 21 (1995), 125-130.

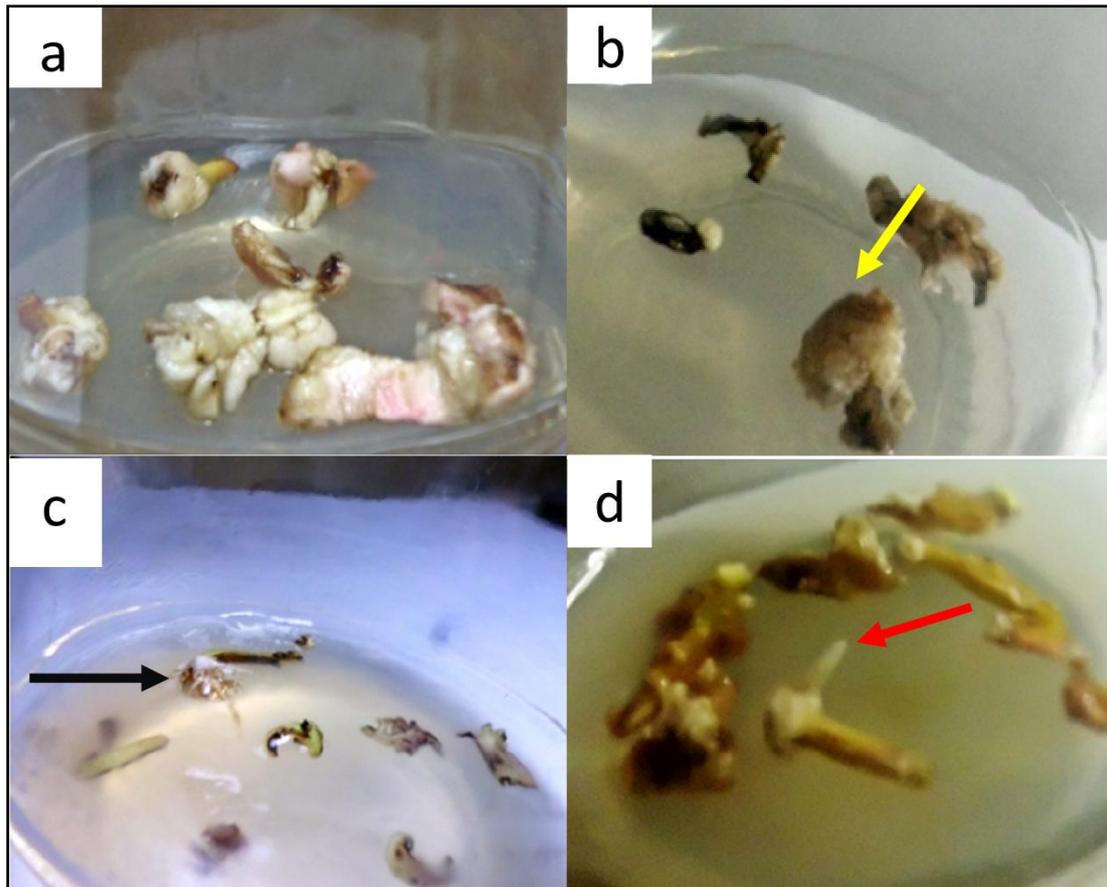
- Dodd, B., 1993. *Plant tissue culture for horticulture*. School of life Science. Queensland University Of Technology.
- Figueira, A., A. Whipkey., J. Janick., 1991., *Increased CO₂ And Light Promote In Vitro Shoot Growth And Development Of Theobroma cacao L.* J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116(3): 585-589.
- Gati, E dan I, Mariska, 1992, *Pengaruh Auksin Dan Sitokinin Terhadap Pembentukan Kalus Mentha piperita Linn.*, Buletin Littri 3 : 1-4.
- George, E, F., 1993, *Plant Propagation By Tissue Culture, Part 1, 2nd Edition*, Exegetic Limited, England.
- Jauhari, A, A., dan Budisantoso, W., 2010, *Analisis Kebijakan Kakao Nasional Dalam Meningkatkan Perolehan Petani Kakao Dan Peanan Kakao Nasional Di Pasaran Dunia (Sebuah Pendekatan Sistem Dinamik)*. Public/ITS-Undergraduate.
- Nadar, H. M., dan D.J. Heinz, 1977, *Roots and Shoot Development From Sugarcane Callus Tissue*. Crop Sci. 17:814-816.
- Nurwahyuni, I., dan Puspa, D, T., 1994, *Induksi Kalus Dan Regenerasi Dioscorea composita Hemsl*, Hayati, Juni 1994.
- Purnamaningsih, R., 2002, *Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya*, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Buletin AgroBio 5(2):51-58.
- Rahayu, B., Solichatun, dan E, Anggarwulan, 2002, *PengaruhAsam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultu rKalus Acalypha indica L.*, Jurnal Biofarmasi 1 (1) : 1-6, Februari 2003.
- Seswita, D., 2010, *Penggunaan Aplikasi Air Kelapa Sebagai Zat Pengatur Tumbuh Pada Multiplikasi Tunas Temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb.) In Vitro*, Jurnal Litri 16(4), Desember 2010.
- Silva, T. E. R. T., Cidade, L. C., Alvim, F. C, Cascardo, J. C. M. , dan Costa, M, G, C., 2009, *Studies On Genetic Transformation Of Theobroma cacao L. : Evaluation Of Different Polymines And Antibiotics On Somatic Embryogenesis And The Efficiency Of uidA Gene Transfer by Agrobacterium tumefaciens*, Plant cell Tissue Organ Culture (2009) 99 : 287-298.
- Surachman, D., 2011, *Teknik Pemanfaatan air kelapa untuk perbanyakan nilamsecara in vitro*, Buletin Teknik Pertanian Vol. 16, No 1, 2011: 31-33.
- Tsai and Kinsella. 1981. *Tissue culture Of Cocoa Beans And Growth Of Cells And Calli In Culture*, Institute Of Food Science, Cornell University, Ithaca. New York.
- Tsuro, M *et al.*, 1998, *Comparison Effect Of Different Types Of Cytokinin For Shoot Formation And Plant Regeneration In Leaf-Derived Callus Of Lavender, (Lavandula Vera DC)*, Laboratory Of Plant Breeding Science, Faculty Of Agriculture, Kyoto Prefecural University, Shimogamo-Handi Sakyoku, Kyoto 606-8522, Japan.
- Veco, 2011, *Increased incomes for Indonesian cocoa farmers in sustainable markets: NGO-private sector cooperation on Sulawesi island*. September 2011/veco-ngo.org.

Winarsih, S., D. Santoso, T. Wardiyati. 2002. *Embriogenesis somatik dan regenerasi dari eksplan embrio zigotik kakao (Theobroma cacao L.)*. Pelita Perkebunan 18: 99-108.



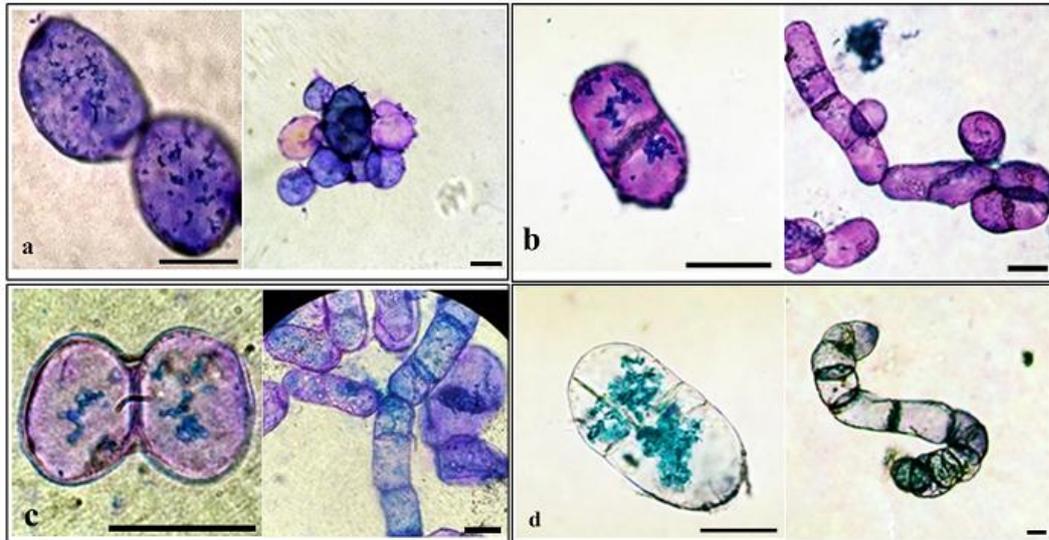
Gambar 1. Grafik hubungan antara medium perlakuan dengan saat munculnya kalus (HST)

Keterangan: Semua perlakuan yang dicobakan dapat menginduksi kalus. Pertumbuhan kalus dihasilkan pada hari ke 6 setelah kultur. Medium terbaik untuk pertumbuhan kalus yaitu pada medium MS dengan penambahan 2,4-D 2ppm dan 15 % air kelapa. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji BNJ 5%. Nilai diatas grafik menunjukkan rata-rata pengukuran hari munculnya kalus. Garis hitam diatas grafik menunjukkan standar error



Gambar 2. Morfologi Kalus Pada Setiap Medium, Umur 2 Minggu Setelah Munculnya Kalus.

Keterangan: (a)Medium N1., Kalus berwarna Putih dan Kompak dan remah. (b) Medium N2., Kalus berwarna Coklat dan remah (tanda panah kuning). (c) Medium N3., Kalus Berwarna putih, remah dan menghasilkan akar (tanda panah hitam). (d) Medium N4., Kalus Berwarna putih, remah dan menghasilkan akar (tanda panah merah).



Gambar 3. Bentuk sel kalus *Theobroma cacao* L.

Keterangan: Sel kalus memperlihatkan aktivitas pembelahan sel. Gambar sebelah kiri merupakan bentuk sel dengan perbesaran kuat, garis hitam dibawah gambar menunjukkan skala 1 μ m.dan gambar disebelah kanan menunjukkan bentuk sel dengan perbesaran lemah, garis hitam dibawah gambar menunjukkan skala 5 μ m. Gambar bagian a, b, c dan d merupakan bentuk sel kalus pada medium perlakuan masing-masing N1, N2, N3 dan N4.