

PERTANIAN

INDUKSI SOMATIK EMBRIOGENESIS PRIMER KAKAO (*Theobroma cacao* L.) MELALUI EKSPLAN PETAL DAN STAMINODIA DENGAN MENGGUNAKAN 2,4-DICHLOROPHENOXY ACETIC ACID DAN BENZILAMINOPURIN

*Primary Somatic Embryogenesis Induction of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) through Petal and Staminodes Explants Using 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid and Benzilaminopurin*

Arofi Rachman Hakim¹, Denna Eriani Munandar^{1*}, Parawita Dewanti¹

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

Jln. Kalimantan 37, Kampus Tegal Boto, Jember 68121

*e-mail : dennaerianimunandar@yahoo.com

ABSTRACT

*The need of quality cocoa seeds progressively increases. The needs of Cocoa seedlings is higher and higher. There are several techniques of cocoa propagation that can be applied but still have not been able to meet the needs of cocoa seeds constrained by a long time, so that it is necessary to implement effective propagation, one of which is by somatic embryogenesis. However, this technique needs appropriate methods such as the selection of explants and growth regulating substances because not all explants are capable of forming somatic embryogenesis. The research was conducted to induce primary somatic embryogenesis of cocoa (*Theobroma cacao* L.) through petals and staminodes explants by using 2,4-D and BAP. The experiment was conducted at Laboratory of Tissue Culture, Faculty of Agriculture, University of Jember. The research was designed using completely randomized design (CRD), which consisted of two factors: factors concentration combination of growth regulating substances and types of explant. The results showed that treatment of 3 ppm 2,4-D + 1.5 ppm BAP using staminodes produced callus formation percentage of 54.94%, callus fresh weight of 1.09 g with white, crumb structure. Meanwhile, the parameter of the fastest time of callus formation was found in the treatment of 1 ppm 2,4-D + 0.5 ppm BAP, that is, 7.2 days. Staminodes explants were the most responsive to produce callus percentage of 50.34%.*

Keywords: *growth regulating substances, petal, primary somatic embryogenesis, staminodes.*

ABSTRAK

Kebutuhan bibit kakao unggul semakin lama semakin meningkat. Kebutuhan bibit kakao semakin lama semakin tinggi. Ada beberapa teknik perbanyakan kakao yang dapat dilakukan namun masih belum mampu memenuhi kebutuhan bibit kakao tersebut karena terkendala waktu yang lama sehingga diperlukan teknik perbanyakan yang efektif salah satunya melalui somatik embriogenesis primer. Namun didalam teknik tersebut memerlukan metode yang tepat seperti pemilihan eksplan dan zat pengatur tumbuh karena tidak semua eksplan mampu membentuk somatik embriogenesis. Penelitian dilakukan untuk menginduksi somatik embriogenesis primer kakao (*Theobroma cacao* L.) melalui eksplan petal dan staminodia dengan menggunakan 2,4-D dan BAP. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Jember. Penelitian dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 2 faktor yaitu faktor kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh dan jenis eksplan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan 3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP menggunakan staminodia menghasilkan persentase terbentuknya kalus sebesar 54,94%, berat segar kalus 1,09 g dengan struktur remah berwarna putih. Sedangkan parameter waktu terbentuknya kalus tercepat ditemukan pada perlakuan 1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP yaitu 7,2 hari.. Eksplan staminodia merupakan yang paling responsif dalam menghasilkan persentase berkalus sebesar 50,34%.

Kata kunci : *petal, staminodia, somatik embriogenesis primer, zat pengatur tumbuh.*

How to cite : Hakim, A. R., D. E. Munandar, and P. Dewanti. 2014. Induksi Somatik Embriogenesis Primer Kakao (*Theobroma cacao* L.) melalui Eksplan Petal dan Staminodia dengan menggunakan 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid dan Benzilaminopurin. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(1): xx-xx

PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan unggulan di Indonesia yang memiliki potensi dalam usaha pengembangannya di samping kelapa sawit dan karet. Tahun 2012 total produksi kakao Indonesia mencapai 936.266 ton dengan luas area mencapai 1.732.954 ha dan 94,2% didominasi oleh perkebunan rakyat (Ditjenbun, 2012). Meski luas area dan produksi kakao Indonesia meningkat pesat pada dekade terakhir tetapi produktivitas rata-rata kakao Indonesia baru mencapai 625 kg/ha/tahun, padahal potensinya lebih dari 2.000 kg/ha/tahun (Ditjenbun 2008). Hal ini disebabkan salah satunya penerapan teknologi budidaya oleh petani yang masih sederhana dengan penggunaan bahan tanam yang mutunya kurang baik serta usia tanaman yang sudah tua sehingga pada tahun 2009 pemerintah

melakukan program revitalisasi yang dikenal dengan Gerakan Nasional Revitalisasi Program Kakao (GERNAS Pro-Kakao).

Keberhasilan program revitalisasi kakao adalah dengan penerapan inovasi teknologi termasuk pengadaan bibit bermutu yang seragam dalam jumlah banyak. Kebutuhan tersebut sulit dipenuhi apabila pengadaan bibit dilakukan secara konvensional yang umumnya diperoleh melalui metode stek, sambungan dan okulasi (Winarsih *et al.*, 2003). Sehingga diperlukan alternatif perbanyakan perbanyakan bibit kakao dalam jumlah besar dan waktu singkat yaitu dengan kultur jaringan (Ragapadmi, 2002). Perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan dapat dilakukan melalui multiplikasi (perbanyakan) tunas dari mata tunas aksilar, pembentukan tunas adventif, dan somatik embriogenesis (SE) (Jimenez, 2001).

Diantara beberapa teknik kultur jaringan tanaman, somatik embriogenesis menawarkan protokol alternatif dan efisien dalam regenerasi tanaman (Xie *et al.*, 2013). Pada embriogenesis somatik tidak langsung, induksi kalus merupakan faktor penentu keberhasilan untuk memperbanyak tanaman (Ibrahim *et al.*, 2010). SE primer adalah kalus embriogenik yang terbentuk dari eksplan pada tahap inisiasi. Kalus embriogenik biasanya diperoleh dari embrio benih, nucelus atau jaringan meristematis lainnya seperti primordia bunga. SE dipengaruhi oleh jenis eksplan dan formulasi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang berbeda pada setiap tahap perkembangannya. Beberapa eksplan yang berhasil diperbanyak dengan kultur jaringan adalah daun muda, nuselus, embrio zigotik dan seluruh bagian-bagian bunga (Sondahl *et al.*, 1993; Alemanno *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998; Avivi, 2011).

ZPT yang sering ditambahkan kedalam media kultur adalah auksin dan sitokinin. Pada induksi kalus embriogenik, kultur umumnya ditumbuhkan di media yang mengandung auksin yang mempunyai aktifitas kuat. Dari berbagai hasil penelitian menunjukkan *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) merupakan auksin yang efektif untuk induksi kalus embriogenik. Adapun tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini yaitu untuk menginduksi somatik embriogenesis primer menggunakan eksplan petal dan staminodia bunga kakao yang dikulturkan pada media MS yang mengandung berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Jember mulai bulan Maret 2014 sampai Agustus 2014.

Penelitian induksi somatik embriogenesis primer kakao (*Theobroma cacao* L.) melalui eksplan petal dan staminodia dengan menggunakan *2,4-dichlorophenoxy acetic acid* dan *benzylaminopurin* dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas 2 faktor. Faktor pertama adalah kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh (A) terdiri dari 4 taraf, yaitu A1 (0 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP), A2 (1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP), A3 (2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP), A4 (3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP), A5 (4 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP). Faktor kedua adalah jenis eksplan (S) terdiri dari 2 taraf yaitu S1 (petal) dan S2 (staminodia) Masing-masing kombinasi perlakuan diulang sebanyak 5 kali.

Pembuatan media MS. Pembuatan media diawali dengan menakar masing-masing larutan stok terlebih dahulu sesuai volume yang diinginkan. Larutan-larutan stok untuk media MS antara lain stok A, B, C, D, E, F, mio-inositol, dan vitamin. Semua larutan stok dimasukkan kedalam *beaker glass* kecuali agar dan ditambahkan gula 30 g dan aquadest hingga mencapai volume 1.000 ml (1 liter). Setelah itu larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer*. Selanjutnya zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP ditambahkan pada masing-masing media sesuai perlakuan. Derajat keasaman larutan diatur pada kondisi 5,8. Setelah kondisi pH stabil, larutan dimasukkan kedalam panci yang telah berisi agar sebanyak 8 g/L dan dipanaskan sampai mendidih. Media dituang kedalam masing-masing botol kultur. Botol kultur kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil* dan diikat dengan karet gelang. Botol-botol kultur yang berisi media perlakuan disterilkan dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 17,5 psi (*pound per square inch*) selama ± 20 menit. Setelah selesai botol kultur disimpan ke dalam rak kultur.

Sterilisasi dan Penanaman Eksplan. Kuncup bunga kakao yang digunakan dalam percobaan ini berukuran 3-6 mm. Kuncup bunga kakao diambil pada pagi hari sebelum jam 8 pagi. Proses persiapan eksplan dilakukan berdasarkan prosedur Young *et al.*, (2003) dalam Zuyasa dan Hafshah (2013), yang telah dimodifikasi

sebelumnya. Bunga kakao dikumpulkan dalam wadah yang berisi air steril. Selanjutnya bunga dibilas menggunakan air mengalir. Di dalam LAF dilakukan proses sterilisasi dengan mencelupkan kuncup bunga kedalam larutan alkohol 70% selama 20 detik dan dilanjutkan dengan larutan *clorox* 10% dan 5 tetes *tween 20* selama 5 menit sambil digojog, selanjutnya dicuci dengan menggunakan air steril sebanyak 3-4 kali atau hingga busa berkurang. Bunga kemudian dipisah sesuai bagian-bagiannya yaitu petal dan staminodia menggunakan *scalpel* steril. Selanjutnya bagian-bagian bunga kakao ditanam kedalam kombinasi media MS. Kultur di inkubasi pada suhu 17-23°C dengan intensitas cahaya selama 16 jam terang dan 8 jam gelap

Parameter pengamatan yang digunakan dalam penelitian antara lain:

1. Waktu terbentuknya kalus;

Waktu terbentuknya kalus dihitung sejak hari pertama eksplan dikulturkan. Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati perkembangan eksplan yang mulai penanaman hingga terbentuknya kalus. Pengamatan bertujuan untuk mengetahui waktu eksplan mulai berkalus pada masing-masing media kombinasi perlakuan.

2. Persentase kalus yang terbentuk;

Pengamatan dilakukan dengan cara menghitung jumlah eksplan yang membentuk kalus. Hal ini bertujuan untuk mengetahui berapa persen kalus yang mampu dibentuk oleh tiap-tiap perlakuan. Pengamatan dilakukan dari hari saat munculnya kalus hingga akhir pengamatan. Persentase eksplan berkalus didapatkan dari jumlah eksplan yang membentuk kalus per botol kultur dan dihitung hingga hari ke 28 sejak awal kultur. Masing-masing botol kultur diisi 5 eksplan dengan perhitungan:

$$\text{Persentase eksplan berkalus (\%)} = \frac{\text{Jumlah eksplan yang berkalus} \times 100\%}{\text{Jumlah eksplan perbotol}}$$

3. Berat segar kalus;

Berat segar kalus diukur dengan dengan cara menimbang pada timbangan analitik. Berat segar kalus didapatkan dari pengurangan pengurangan berat basah kalus beserta botol kultur lengkap dengan penutupnya dengan berat botol kultur (tanpa kalus) dan penutupnya.

$$WW = WW_t - WW_o$$

Keterangan: WW (berat segar kalus)

WW_t (berat segar kalus awal + botol kultur + penutup)

WW_o (berat botol kultur akhir + penutup)

4. Warna dan tekstur kalus;

Pengamatan dilakukan dengan cara mengamati secara visual bagian morfologi kalus yaitu melihat butiran-butiran kalus, warna kalus, dan struktur kalus yang terbentuk. Pengamatan warna kalus dilakukan secara kuantitatif menggunakan Munsell dengan indikasi:

- Warna kalus putih menandakan kondisi kalus yang baik;
- Warna kalus kuning menandakan kondisi kalus yang hanya mengalami pembengkakan eksplan saja. Biasanya ditemukan pada eksplan petal;
- Warna kalus coklat atau hitam menandakan kondisi kalus yang mulai menurun perkembangannya.

Sedangkan pengamatan struktur kalus berdasarkan analisis kualitatif meliputi data visual yang dianalisis dengan metode deskriptif yaitu:

- Tekstur kompak (*non friable*) merupakan sekumpulan sel yang kuat dan terlihat padat.
- Tekstur remah (*friable*) merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah lepas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil kuadrat tengah pada percobaan induksi somatik embriogenesis primer menggunakan eksplan petal dan staminodia bunga kakao yang dikulturkan pada media MS yang mengandung berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP pada tiga pengamatan disajikan dalam Tabel 1.

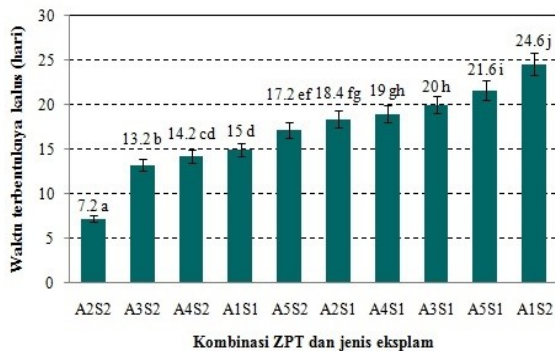
Tabel 1. Nilai kuadrat tengah untuk parameter pengamatan waktu terbentuknya kalus, persentase eksplan berkalus, dan berat segar kalus.

No.	Parameter Pengamatan	Kuadrat Tengah			
		Kombinasi ZPT	Jenis Eksplan	Interaksi	Galat
1.	Waktu terbentuknya kalus	1.475 ns	1.413 ns	3.431 *	1.116
2.	Persentase eksplan berkalus	1835.792 **	3400.98 0 **	77.826 ns	295.97 9
3.	Berat segar kalus	0.028 **	0.000 ns	0.006 ns	0.003

Keterangan : * : Berbeda nyata
 ** : Berbeda sangat nyata
 ns : Berbeda tidak nyata

Berdasarkan hasil kuadrat tengah pada Tabel 1 menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara kombinasi zat pengatur tumbuh dan jenis eksplan yang memberikan pengaruh nyata pada parameter waktu terbentuknya kalus namun memberikan pengaruh tidak nyata pada parameter berat segar kalus dan persentase eksplan berkalus. Semua faktor tunggal kombinasi ZPT berbeda sangat nyata kecuali parameter waktu terbentuknya kalus sedangkan faktor tunggal semua jenis eksplan tidak berbeda nyata kecuali parameter persentase eksplan berkalus.

Hasil kuadrat tengah pada Tabel 1 menunjukkan bahwa interaksi kombinasi zat pengatur tumbuh dan jenis eksplan memberikan pengaruh yang nyata pada parameter waktu terbentuknya kalus. Data rata-rata interaksi waktu terbentuknya kalus dapat dilihat pada Gambar 1.



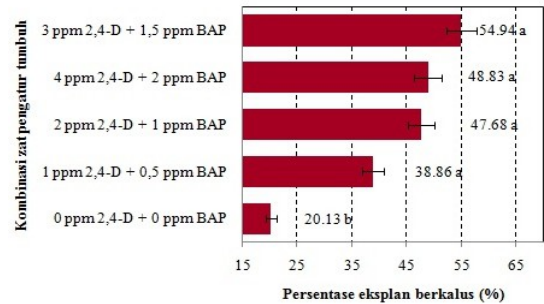
Gambar 1 Waktu terbentuknya kalus pada berbagai perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh dan jenis eksplan.

Gambar 1 menunjukkan waktu terbentuknya kalus terbaik adalah pada perlakuan 1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP menggunakan staminodia yaitu 7,2 hari sedangkan waktu terbentuknya kalus paling lambat pada perlakuan 0 ppm 2,4-D dan 0 ppm BAP menggunakan eksplan staminodia yaitu 24,6 hari.

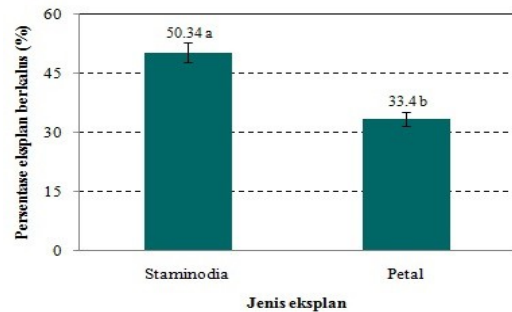
Hasil kuadrat tengah pada Tabel 1 menunjukkan interaksi antara kombinasi zat pengatur tumbuh tidak berbeda nyata terhadap jenis eksplan yang digunakan namun berbeda sangat nyata pada masing-masing faktor tunggalnya. Data rata-rata perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh terhadap persentase eksplan berkalus dapat dilihat pada Gambar 4.4 dan data rata-rata jenis eksplan terhadap persentase eksplan berkalus dapat dilihat pada Gambar 2.

Gambar 2 menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh 3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP menghasilkan persentase eksplan berkalus lebih tinggi yaitu 54,94%. Eksplan yang ditanam perlakuan selain 3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP

memberikan respon pertumbuhan yang baik dengan ditandai pembentukan kalus pada sebagian atau seluruh permukaan eksplan. Ini menunjukkan pada awal pengkulturkan eksplan membutuhkan konsentrasi 2,4-D dan BAP lebih banyak.



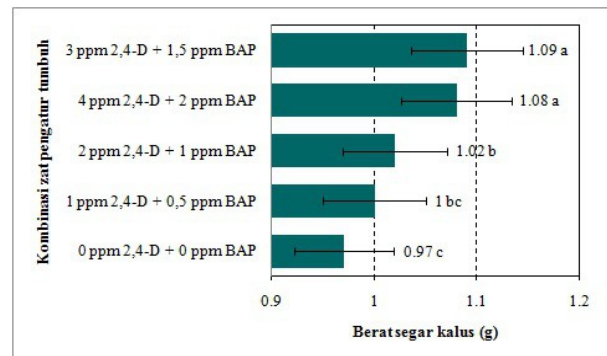
Gambar 2 Pengaruh kombinasi zat pengatur tumbuh terhadap persentase eksplan berkalus.



Gambar 3 Pengaruh jenis eksplan terhadap persentase eksplan berkalus.

Jika dilihat dari faktor jenis eksplan, staminodia memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan petal terhadap hasil rata-rata parameter persentase eksplan berkalus. Berdasarkan Gambar 3 eksplan staminodia menghasilkan rata-rata 50,34% berbeda nyata dengan petal yang hanya menghasilkan 33,84%.

Berdasarkan hasil kuadrat tengah pada Tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan kombinasi zat pengatur tumbuh dan jenis eksplan yang digunakan tidak berpengaruh nyata terhadap pertambahan berat segar kalus tetapi pengaruh nyata pada perlakuan tunggal kombinasi zat pengatur tumbuhnya. Data rata-rata perlakuan zat pengatur tumbuh terhadap berat segar kalus disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4 Pengaruh kombinasi zat pengatur tumbuh terhadap berat segar kalus.

Dari hasil penelitian didapat bahwa semakin tinggi kombinasi 2,4-D dan BAP yang ditambahkan ke media MS ternyata mampu meningkatkan berat basah kalus yang

dihasilkan. Berdasarkan Gambar 3 kombinasi 3 ppm 2,4-D dan 1,5 ppm BAP memberikan berat basah akhir kalus yang terbaik tetapi kombinasi tersebut tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata pada perlakuan kombinasi 4 ppm 2,4-D dan 2 ppm BAP. Perlakuan 3 ppm 2,4-D dan 1,5 ppm BAP dan 4 ppm 2,4-D dan 2 ppm BAP secara konsisten memberikan pengaruh positif terhadap berat segar kalus yaitu 1,09 gr sehingga dapat dikatakan bahwa kedua kombinasi perlakuan berpengaruh baik terhadap kualitas pertumbuhan kalus *Theobroma cacao* L. Selanjutnya perlakuan 3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP dan 4 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP berbeda nyata dengan perlakuan 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP tetapi perlakuan 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP tidak berbeda nyata dengan perlakuan 1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP.

Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang digunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Turham (2004), menyebutkan tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam yaitu kompak (*non friable*), intermediet dan remah (*friable*). Kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah. Tekstur kalus yang remah dianggap baik karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal, disamping itu dapat aerasi oksigen antar sel. Dengan demikian, dengan struktur tersebut upaya untuk perbanyakkan dalam hal jumlah kalus lebih mudah. Hasil data kualitatif parameter tekstur kalus disajikan Tabel 2.

Tabel 2 Pengaruh kombinasi zat pengatur tumbuh dan jenis eksplan terhadap tekstur kalus.

Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh	Jenis Eksplan	Persentase Tekstur Kalus
0 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP	Petal	Kompak 100%
1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	Petal	Remah 50%
2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	Petal	Kompak 100%
3 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP	Petal	Remah 75%
4 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP	Petal	Remah 50%
0 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP	Staminodia	Remah 25%
1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	Staminodia	Kompak 50%
2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	Staminodia	Kompak 100%
3 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP	Staminodia	Remah 50%
4 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP	Staminodia	Kompak 100%

Penggunaan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan BAP pada semua media yang digunakan menghasilkan kalus dengan tekstur sebagian remah dan sebagian kompak. Kalus dengan tekstur remah merupakan kalus yang terbentuk dari sekumpulan sel yang mudah lepas sedangkan kalus kompak terdiri dari sekumpulan sel yang kuat. Berdasarkan Tabel 2 kalus remah dihasilkan pada perlakuan 3 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP menggunakan petal yaitu 75%. Sedangkan kalus remah 50% diperoleh pada perlakuan 1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP menggunakan petal, dan 4 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP menggunakan petal dan 3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP menggunakan staminodia.

Selain tekstur, warna kalus juga merupakan indikator pertumbuhan eksplan secara *in vitro*. Melalui indikator ini dapat diketahui apakah kalus tersebut masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau telah mati. Masing-masing tanaman menghasilkan warna kalus yang berbeda-beda. Biasanya kalus yang baik memiliki warna hijau karena mengandung klorofil sedangkan warna putih mengindikasikan bahwa kondisi kalus cukup baik. Warna kalus yang semakin gelap (coklat/hitam) berarti pertumbuhan kalus semakin menurun (Tabel 3). Warna kalus disajikan pada Tabel 4.4.

Tabel 3 Persentase warna kalus putih pada eksplan petal dan staminodia yang dikulturkan kedalam media MS yang diperkaya berbagai kombinasi zat pengatur tumbuh.

Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh	Jenis Eksplan	Persentase Kalus Putih
0 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP	Petal	0

1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	Petal	20
2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	Petal	0
3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP	Petal	20
4 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP	Petal	0
0 ppm 2,4-D + 0 ppm BAP	Staminodia	40
1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm BAP	Staminodia	60
2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	Staminodia	40
3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP	Staminodia	80
4 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP	Staminodia	60

Pengamatan morfologi kalus yaitu meliputi pengamatan bentuk fisik kalus, warna dan tipe kalus dapat diketahui bahwa setiap perlakuan menghasilkan kalus yang berbeda-beda baik warna maupun tipe kalus yang dihasilkannya. Perlakuan yang menghasilkan kalus yang lebih baik yaitu pada perlakuan 4 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP menggunakan staminodia karena massa kalus yang dihasilkan pada perlakuan ini relatif lebih besar dan menghasilkan kalus yang bertipe kompak. Pada perlakuan 2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP menggunakan petal meskipun menghasilkan kalus yang bertipe kompak namun massa kalus yang dihasilkan lebih kecil dan pertumbuhannya tidak seragam.

Pembentukan kalus diawali dengan pembengkakan potongan sisi eksplan dengan munculnya agregat sel bergerombol tidak terorganisir pada sekitar bagian pelukaan. Pembengkakan yang terjadi merupakan suatu proses pertumbuhan awal dalam penyerapan nutrisi dari media yang selanjutnya disertai dengan tahapan proliferasi (perbanyakkan sel). Proses ini diduga sangat erat kaitannya dengan kemampuan sel tumbuhan untuk mempertahankan strukturnya. Dinding sel dan plasmalemma sedikit demi sedikit mengembang/mengendur melalui aktifitas metabolik, yang mengakibatkan air masuk ke dalam sel untuk mengisi celah kosong. Serat-serat selulosa penyusun dinding sel disintesis kembali melalui celah-celah yang terbentuk (Suryowinoto, 1996). Meskipun semua konsentrasi 2,4-D dan BAP yang dicobakan dapat menginduksi kalus, namun penggunaan 2,4-D pada konsentrasi rendah (0 ppm 2,4-D dan 0 ppm BAP) menstimulasi pembentukan kalus lebih lama. Hal ini dimungkinkan karena dalam pertumbuhannya, baik eksplan petal dan staminodia tidak hanya membutuhkan hormon endogen tetapi juga eksogen. Terhambatnya pembentukan kalus dikarenakan hormon endogen yang dimiliki belum mampu merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat.

Kalus yang diinduksi melalui eksplan petal dan staminodia terjadi tidak dalam waktu yang bersamaan. Lamanya waktu yang dibutuhkan untuk menginduksi kalus ini diduga karena menggunakan media padat MS, sehingga penetrasi media ke dalam eksplan untuk pembelahan jaringan sel-sel berlangsung cukup lama. Selain itu masing-masing eksplan memiliki sifat totipotensi sel yang berbeda pula sehingga penggunaan zat pengatur tumbuh sangat penting dalam proses inisiasi kalus. Semua perlakuan yang dicobakan mampu menginduksi kalus meskipun tidak semuanya sama.

Setelah beberap hari setelah eksplan dikulturkan, eksplan petal hanya mengalami pembengkakan jaringan saja lalu berubah warna yang semula putih kuning menjadi kuning kecoklatan. Perubahan warna pada eksplan petal ini diduga akibat dari konsentrasi 2,4-D pada media induksi terlalu tinggi sehingga bersifat toksik pada tanaman, karena 2,4-D mempunyai sifat fitotoksitas yang tinggi sehingga dapat menghambat induksi rediferensiasi dan reinisiasi dari pembelahan sel. Pertumbuhan yang lambat disebabkan oleh konsentrasi auksin yang tinggi melebihi konsentrasi optimum sehingga dapat menghambat pembesaran sel (*cell enlargement*). Pemberian auksin saja tanpa sitokinin dalam kultur jaringan hanya menyebabkan sel-sel akan membesar tanpa proses pembelahan

sel, sehingga tidak memberi pengaruh apapun tetapi apabila auksin dan sitokinin digunakan secara bersamaan, maka sel-sel akan membelah diri secara optimal.

Selain faktor eksplan, waktu terbentuknya kalus juga dipengaruhi oleh kombinasi kedua macam zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada media kultur turut mempengaruhi laju pertumbuhan sel. Meskipun semua konsentrasi 2,4-D dan BAP yang dicobakan dapat menginduksi kalus, namun penggunaan 2,4-D pada konsentrasi rendah (0 ppm 2,4-D dan 0 ppm BAP) menstimulasi pembentukan kalus lebih lama. Hal ini dimungkinkan karena dalam pertumbuhannya, baik eksplan petal dan staminodia tidak hanya membutuhkan hormon endogen tetapi juga eksogen. Terhambatnya pembentukan kalus dikarenakan hormon endogen yang dimiliki belum mampu merangsang pertumbuhan kalus dengan cepat.

Hampir semua bagian vegetatif dan generatif tanaman kakao mempunyai sifat mudah berkalus. Persentase eksplan yang membentuk kalus secara genetis sangat dipengaruhi oleh kandungan hormon endogen dalam jaringan tanaman kakao yang cukup untuk menginduksi kalus. Adanya perbedaan respon dalam pembentukan kalus disebabkan karena perbedaan penggunaan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan kedalam masing-masing media perlakuan. Penambahan zat pengatur tumbuh pada media kultur jaringan mempengaruhi laju pertumbuhan sel dari eksplan yang dikulturkan. Sebelum membentuk kalus, eksplan menunjukkan perubahan fisik. Pada awalnya eksplan petal berbentuk lurus kemudian berubah menjadi bengkak (*swelling*) dan membesar serta berwarna lebih terang dibandingkan dengan sebelum eksplan dikulturkan. Sedangkan eksplan staminodia melengkung lalu mengalami pembesaran dan perubahan warna yang awalnya berwarna kuning menjadi kuning kecoklatan. Eksplan petal melengkung dan membengkak disebabkan adanya pengaruh auksin dan tekanan turgor. Zat pengatur tumbuh pada media kultur akan berdifusi kedalam jaringan tanaman melalui pangkal eksplan yang terluka akibat irisan. Munculnya kalus ditandai dengan munculnya gumpalan sel berwarna putih. Selanjutnya gumpalan tersebut akan membentuk massa sel yang disebut kalus. Pada akhir periode inisiasi ini sering dijumpai kelompok kalus berbentuk globular pada permukaan eksplan.

Pada kombinasi perlakuan yang tidak dapat menginduksi kalus hampir semuanya eksplan pada awal inkubasi terlihat membengkak dan melengkung. Hal ini mengindikasikan eksplan mulai menyerap hara dan zat pengatur tumbuh yang terdapat dalam media, namun akhirnya respon terhenti yang berakhir dengan matinya eksplan yang ditandai dengan perubahan warna menjadi coklat atau hitam. Terhentinya respon tersebut dimungkinkan beberapa faktor seperti konsentrasi 2,4-D dan BAP yang terlampaui kecil sehingga tidak mampu memacu induksi kalus, atau konsentrasi 2,4-D dan BAP yang terlalu tinggi yang justru bersifat toksik bagi eksplan yang akhirnya menyebabkan eksplan mati, atau perbandingan konsentrasi yang tidak seimbang antara 2,4-D dan BAP sehingga interaksi keduanya tidak cocok bagi eksplan untuk merangsang pembentukan kalus.

KESIMPULAN

Hasil percobaan menunjukkan bahwa kombinasi zat pengatur tumbuh 3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm BAP dengan menggunakan eksplan staminodia yang menghasilkan persentase eksplan berkalus 54,94%, berat segar kalus 1,09 gr dengan tekstur remah dan berwarna putih.

DAFTAR PUSTAKA

Alemanno L., M. Berthouly, N. Michaux-Ferriere. 1997. A Comparison Between *Theobroma cacao* L. Zigotic

Embryogenesis And Somatic Embryogenesis From Floral Explants. *In Vitro Cell Dev. Bio. Plant* 33: 163-172.

Avivi, S. 2011. Regenerasi Embrio Zigot Kakao (*Theobromacacao* L.) dengan Penambahan Kinetin pada Media B5. *Jurnal Ilmu Dasar* Vol. 12 No. 2. 2011: 132-139.

B, Lakitan. 1995. *Fisiologi Pertumbuhan dan perkembangan Tanaman*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.

Ditjenbun (Direktorat Jenderal Perkebunan). 2008. Gerakan Peningkatan Produksi dan Mutu Kakao Nasional. Direktorat Jenderal Perkebunan, Jakarta. <http://ditjenbun.deptan.go.id>.

Ditjenbun (Direktorat Jenderal Perkebunan). 2012. *Statistik Perkebunan Kakao Indonesia 2011-2013*. Direktorat Jenderal Perkebunan, Jakarta. 60 hlm.

Jimenez, V.M. 2001. Regulation of In Vitro Somatic Embryogenesis with Emphasis on the Role of Endogenous Hormones. *R. Bras. Physiol. Veg.* 13(2): 196-223.

Li Z., A. Traore, S. Maximova, M.J. Guiltinan. 1998. Somatic Embryogenesis And Plant Regeneration From Floral Explants Of Cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34: 2293-2299.

Ragapadmi, P. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Buletin Agro Bio.* 5(2): 51-58.

Sondahl, M.R., S. Liu, C. Bellato, A. Bragin. 1993. Cocoa somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae* 336: 245-248.

Suryowinoto, M. 1996. Prospek Kultur Jaringan dalam Perkembangan Pertanian Modern. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta

Taiz L, and Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. 2nd Edition. Sinauer Associates Inc. Sunderland.

Turham, H. 2004. Callus Inductions and Growth in transgenic Potato Genotypes. *African Journal of Biotechnology* 3 (8): 375-378

Widayanto, W. 2004. Pengaruh 2,4-D dan Kinetin terhadap Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan serta kandungan Metabolit Sekunder Kalus Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) Secara In Vitro. Skripsi Tidak Diterbitkan. Surakarta : Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret.

Winarsih, S., D, Santoso., dan T. Wardiyati. 2003. Embriogenesis Somatik Dan Regenerasi Tanaman Pada Kultur In Vitro Organ Bunga Kako. *Pelita Perkebunan.* 19(1): 1-16.

Xie, H., X. Hu, C.R. Zhang, Y.F. Chen, X. Huang and X.L.Huang. 2013. Molecular characterization of a stress related gene *MsTPP* in relation to somatic embryogenesis of alfalfa. *Pak. J. Bot.*, 45(4): 1285-1291.



Zulkarnain, H. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman: Solusi Perbanyak Tanaman Budidaya*. Bumi Aksara, Jakarta. 249 hal.

Zuyasna dan S. Hafsah. 2013. Induksi Embrio Somatik dari Tanaman Kakao Adaptive Aceh Menggunakan Eksplan Bunga serta Zat Pengatur Tumbuh Picloram. *J. Floratek* 8: 1-9