

**RESPON EMBRIO KAKAO (*Theobroma cacao* L.) PADA KONDISI
CEKAMAN NaCl DAN PEG SECARA IN VITRO****Mayasari Yamin¹, Rahman Hairuddin²***Universitas Cokroaminoto Palopo**Mayasariyamin@gmail.com*

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh embrio kakao yang toleran dan peka terhadap kondisi salinitas dan kekeringan secara in vitro berdasarkan perubahan morfologi yang muncul, dan kombinasi salinitas dan kekeringan (NaCl + PEG 6000) yang dapat dijadikan agen seleksi untuk indikator toleran dan peka terhadap salinitas dan kekeringan secara in vitro. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Cokroaminoto Palopo yang berlangsung mulai bulan Januari sampai April 2016. Metode penelitian menggunakan rancangan acak kelompok yang terdiri atas empat perlakuan yang diulang sebanyak tiga kali. Perlakuan yang digunakan yaitu P₀ (media WPM tanpa NaCl dan PEG), P₁ (media WPM 15 g/L NaCl + 1 g/L PEG), P₂ (media WPM 30 g/L NaCl + 1 g/L PEG), dan P₃ (media WPM 45 g/L NaCl + 1 g/L PEG). Karakter yang diamati yaitu persentase embrio hidup dan perubahan morfologi embrio kakao. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi P₀ memberikan persentase embrio hidup dan perubahan morfologi terbaik yaitu masing-masing 100% dan berwarna putih, P₁ yaitu 66,67% dan berwarna putih kecokelatan, P₂ yaitu 33,33% dan berwarna kecokelatan, sedangkan P₃ yaitu 0% dan berwarna coklat kehitaman.

Kata Kunci : Embrio kakao (*Theobroma cacao* L.), NaCl, PEG 6000, toleran.

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara terbesar ketiga mengisi pasokan kakao dunia yang diperkirakan mencapai 20% dengan Negara Asia lainnya seperti Malaysia, Filipina, dan Papua New Guinea (UNCTAD, 2007). Kakao berperan penting dalam pertumbuhan perekonomian Indonesia terutama dalam penyediaan lapangan kerja baru, sumber pendapatan petani dan penghasil devisa bagi negara (Rahardjo, 1999).

Produksi kakao (*Theobroma cacao* L.) di Indonesia tahun 2009 sampai 2013 masing-masing sebesar 820.49 ton, 837.92 ton, 712.23 ton, 740.51 ton, dan 777.54 ton. Hal ini menunjukkan terjadinya penurunan produksi dari tahun 2009 ke tahun 2013 sebesar 42.95 ton. Produksi kakao di Sulawesi Selatan dari tahun 2009 sampai 2013 masing-masing 164.44 ton, 173.76 ton, 142.83 ton, 146.84, 149.86 ton. Berdasarkan data produksi kakao di Sulawesi Selatan menunjukkan terjadi penurunan produksi dari tahun 2009 ke tahun 2013 sebesar 14,58 ton (Direktorat jendral perkebunan, 2013). Penurunan produksi kakao disebabkan meningkatnya lahan marginal yaitu lahan kering dan lahan salin (cekaman lingkungan).

Cekaman kekeringan telah memberikan pengaruh yang buruk bagi produktivitas tanaman dan produksi pangan dunia. Earl dan Davis (2003) menyatakan bahwa cekaman kekeringan mengurangi hasil panen tanaman jagung yang disebabkan

oleh penurunan absorpsi kanopi pada peristiwa radiasi aktif fotosintesis, penurunan efisiensi radiasi, dan penurunan indeks hasil panen. Taiz dan Zeiger (1998) menyatakan cekaman kekeringan akan menurunkan pertumbuhan dan fotosintesis sehingga berdampak pada produksi tanaman.

Cekaman salinitas merupakan peningkatan kadar garam yang akan menurunkan potensi osmotik yang mengakibatkan tanaman berada dalam cekaman garam sekunder (*physiological drought stress*) (Farid dan Rinaldi, 2006). Ghofoor *et al* (2004) lahan salin merupakan lahan yang mendapatkan intrusi air laut lebih dari empat bulan dalam setahun dan mengandung natrium berkisar 8-15%.

Pengembangan kakao pada dua kondisi cekaman lingkungan dapat dilakukan melalui pendekatan non konvensional. Pendekatan non konvensional dapat melalui teknik kultur jaringan dengan mengisolasi bagian dari tanaman protoplasma, sel, jaringan, organ dalam kondisi aseptik sehingga mampu memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap kembali (Watimena *et al.*, 2011). Farid dan Rinaldi (2006) menyatakan bahwa varietas Orba toleran terhadap salinitas dan kekeringan menggunakan agen seleksi NaCl dan PEG 4000. Dewanti *et al* (2009) menghasilkan beberapa klon kakao unggul terhadap kekeringan melalui seleksi embriosomatik yaitu KW215 dan TSH858 yang toleran terhadap PEG 15%. Yunita (2009), Badami dan Achmad (2010) menyatakan bahwa agen seleksi *in vitro* yang digunakan untuk toleransi terhadap kekeringan yaitu PEG dan seleksi tanaman pada kondisi salinitas dapat menggunakan media seleksi Na tinggi.

Penelitian ini bertujuan untuk (1) memperoleh embrio kakao yang toleran dan peka terhadap kondisi salinitas dan kekeringan secara *in vitro* berdasarkan perubahan morfologi yang muncul, dan (2) memperoleh kombinasi salinitas dan kekeringan (NaCl + PEG 4000) yang dapat dijadikan agen seleksi untuk indikator toleran dan peka terhadap salinitas dan kekeringan secara *in vitro*

2. Metode Penelitian

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Cokroaminoto Palopo yang berlangsung mulai bulan Maret sampai April 2016.

Bahan dan Alat

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow Cabinet* (L AFC), autoklaf, cawan petri, panci, lampu spiritus, gelas piala, gelas ukur, cawan petridish, botol kultur, pinset, tangkai scalpel, dan mata scalpel.

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah embrio muda kakao (*Theobroma cacao* L.) yang berasal dari kabupaten luwu selatan, utara, dan timur Kota Palopo Sulawesi Selatan, Na hipklorit, 96% dan 70% alkohol, NaOH, air steril, medium WPM (Lloyd dan McCown, 1980) dalam bentuk padat, air kelapa, agar-agar, kertas pH meter, NAA, BAP, Dithane M-45, Na-hipoklorit, glukosa, label, NaCl, dan PEG 4000.

Metodologi Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok yang diulang sebanyak tiga kali. Perlakuan yang digunakan terdiri atas P₀ (media WPM tanpa NaCl dan PEG), P₁ (media WPM 15 g/L NaCl + 1 g/L PEG), P₂ (media WPM 30 g/L NaCl + 1 g/L PEG), dan P₃ (media WPM 45 g/L NaCl + 1 g/L PEG). Sehingga, terdapat 12 unit percobaan. Metodologi percobaan ini terdiri atas beberapa tahap diantaranya yaitu pengambilan sampel di lapangan, pembuatan media tanam (WPM), sterilisasi eksplan, penanaman, dan pengamatan.

Pembuatan Media Tanam WPM (*Woody Plant Medium*)

Masing-masing larutan stok A-H diukur sesuai konsentrasi yang dibutuhkan untuk pembuatan media WPM. Setelah itu, dimasukkan 5.4 ppm NAA dan 2.2 ppm BAP. Selanjutnya, diukur pH larutan menggunakan kertas pH meter, dengan pH 5.6-5.8. Kemudian dimasukkan kedalam panci, dimasukkan 30 g glukosa, 7 g agar-agar putih, NaCl, dan PEG 4000 sesuai dengan perlakuan. Media yang telah dituang ke masing-masing botol kultur, disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dengan tekanan 17.5 psi.

Sterilisasi Eksplan

Eksplan yang telah diambil di lapangan dibersihkan menggunakan air steril kemudian biji direndam menggunakan 0.1 g/100 ml Dithane M-45 selama ± 30 menit. Setelah itu, benih dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Selanjutnya, benih direndam menggunakan 1% Na hipoklorit selama ± 30 menit. Kemudian, biji dibilas menggunakan

aquades steril sebanyak tiga kali masing-masing 5 menit. Tahap sterilisasi ini dilaksanakan di dalam LAFC.

Penanaman Eksplan

Eksplan yang telah disterilisasi dikeringanginkan di dalam cawan yang dilapisi oleh kertas saring. Selanjutnya, biji-biji tersebut dibelah dengan hati-hati menggunakan pisau scalpel dan pinset steril untuk isolasi embrio. Embrio yang sudah diisolasi, ditanam di media WPM dan embrio dipelihara di ruang inkubasi.

Pengamatan

Pengamatan dilakukan tiap hari untuk mengetahui perubahan yang terjadi pada eksplan yang ditanam dan untuk mengetahui tingkat kontaminasi yang terjadi pada eksplan yang digunakan. Karakter-karakter yang diamati yaitu pengaruh konsentrasi NaCl dan PEG 6000 terhadap persentasi embrio kakao (*Theobroma cacao* L.) dan pengaruh konsentrasi NaCl dan PEG 600 terhadap perubahan morfologi embrio kakao.

3. Hasil dan Pembahasan

Pengaruh Konsentrasi NaCl dan PEG 6000 Terhadap Persentasi Embrio kakao (Theobroma cacao L.) yang Hidup

Persentase hidup embrio kakao terhadap berbagai perlakuan NaCl dan PEG 6000 disajikan pada Tabel 1. Tabel 1 menunjukkan persentase hidup tertinggi yaitu pada perlakuan kontrol (P₀) sebesar 100% diikuti oleh perlakuan P₁ yaitu 66,67%, P₂ yaitu 33,33%, dan P₃ yaitu 0%. Terjadinya penurunan persentasi hidup embrio tersebut disebabkan karena adanya pemberian NaCl sebagai agen seleksi untuk salinitas dan PEG 6000 sebagai agen seleksi untuk cekaman kekeringan.

Tabel 1. Persentase (%) embrio kakao (*Theobroma cacao* L.) hidup

Asal Eksplan	PERLAKUAN			
	Kontrol (P ₀)	15 g/L NaCl + 1 g/L PEG 6000 (P ₁)	30 g/L NaCl + 1 g/L PEG 6000 (P ₂)	45 g/L NaCl + 1 g/L PEG 6000 (P ₃)
Embrio	100%	66,67%	33,33%	0%

Pemberian NaCl dan PEG 6000 sebagai agen cekaman abiotik mempengaruhi respon pertumbuhan tanaman. NaCl menyebabkan tanaman kekurangan air karena adanya peningkatan rasio K⁺/Na⁺ yang merugikan tanaman. Yunita (2009) menyatakan bahwa tanaman yang toleran dan tumbuh pada tanah bergaram mempunyai kandungan garam yang tinggi pada selnya dengan cara menghambur

pemasukan garam, kompartementasi Na⁺ pada vakuola dan mengaktifkan efluks Na⁺. Penggunaan ion anorganik untuk mengatur tekanan osmosis menunjukkan bahwa tanaman harus mampu menoleransi kandungan garam yang tinggi dalam sel. Na⁺ bersifat toksik bagi tanaman karena menekan nutrisi K⁺, aktivitas enzim sitosol, fotosintesis, dan metabolisme (Salaem *et al* 2005).

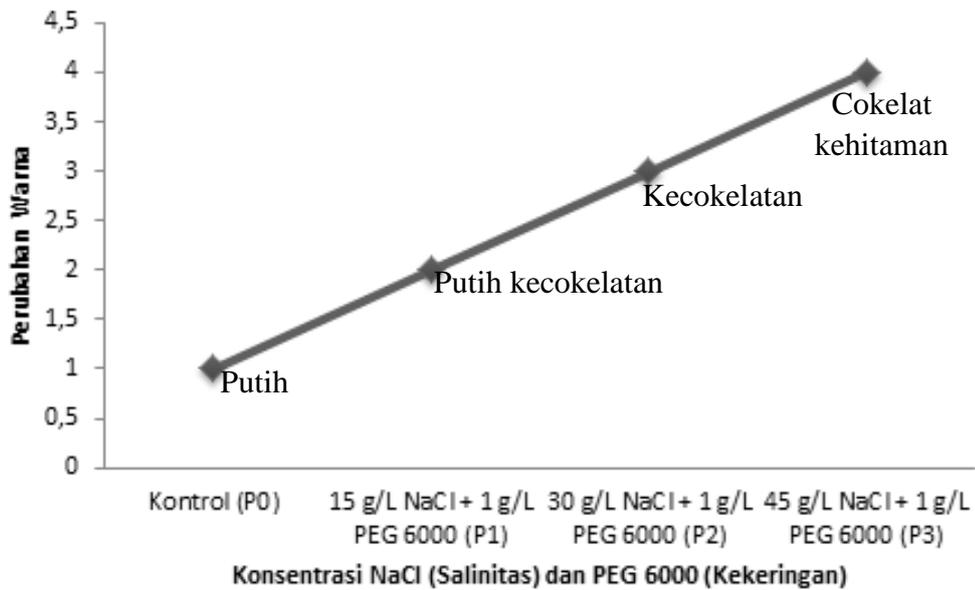
Pemberian PEG 6000 (*Polyethylene glycol*) dalam konsentrasi yang tinggi menyebabkan kerusakan atau kematian tanaman seperti pada perlakuan P3. Hal ini disebabkan karena PEG mempengaruhi rendahnya potensi air secara homogen sehingga membuat kondisi embrio pada media tersebut mengalami kekeringan. Michel dan Kaufmann (1973) menyatakan bahwa besarnya penurunan air sangat tergantung pada konsentrasi dan berat molekul PEG. Hal ini sejalan dengan pendapat Dami dan Hughes (1997) bahwa kematian pada eksplan disebabkan efek kekeringan bukan efek langsung dari senyawa PEG karena senyawa tersebut tidak diserap oleh tanaman

Pengaruh Konsentrasi NaCl dan PEG 6000 Terhadap Perubahan Morfologi Embrio Kakao

Perubahan morfologi embrio kakao diperoleh dari kondisi morfologi embrio setelah dilakukan kultur pada *Woody Plant Medium* (WPM) dengan penambahan NaCl dan PEG 600 selama 21 hari. Kondisi morfologi embrio kakao untuk masing-masing perlakuan dikualitatifkan yang disajikan pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan terjadi perubahan pada perlakuan P1 yaitu putih kesokelatan, P2 yaitu kecokelatan (browning), dan P3 yaitu cokelat kehitaman. Sedangkan untuk perlakuan P0 tidak mengalami perubahan warna. Hal ini disebabkan karena penambahan konsentrasi NaCl dan PEG yang semakin tinggi menyebabkan tanaman letak (mati) karena tidak mampu dalam mentolerir garam yang tinggi dan potensi air yang semakin rendah.

Farid *et al* (2006) menyatakan bahwa adanya molekul NaCl yang mengalami ionisasi menjadi Na⁺ dan Cl⁻ sehingga terjadi peningkatan salinitas pada media yang menginduksi terjadinya cekaman ion dan mengakibatkan kematian embrio kakao yang terjadi pada P3.



Gambar 1. Perubahan warna embrio kakao (*Theobroma cacao* L.)

4. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Cekaman abiotik yang mendominasi lingkungan yaitu cekaman salinitas dan kekeringan. Cekaman salinitas merupakan peningkatan kadar garam yang akan menurunkan potensi osmotik yang mengakibatkan tanaman berada dalam cekaman garam sekunder (*physiological drought stress*). Cekaman kekeringan merupakan penurunan potensi air secara homogen dan menyebabkan perubahan akumulasi prolin dalam jaringan tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan P0 memberikan persentase embrio hidup terbaik yaitu 100% dan secara morfologi embrio berwarna putih, P1 yaitu 66,67% dan berwarna putih kecokelatan, P2 yaitu 33,33% dan berwarna kecokelatan, sedangkan P3 yaitu 0% dan berwarna coklat kehitaman.

Saran

Sebaiknya untuk penelitian selanjutnya menggunakan lebih dari satu varietas (eksplan) kakao dan menggunakan agen seleksi serta pengujian untuk cekaman abiotik maupun biotik agar diperoleh planlet kakao yang mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan yang bervariasi.

Daftar Pustaka

- [1] A. Ghafoor, M. Qadir, G. Murtaza. 2004. Salt-Affected Soils: Principles of Management. Allied Book Centre. Lahore. P304.
- [2] B.E. Michel, M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiol. 57: 914-916.

- [3] Direktorat Jenderal Perkebunan. 2013. Produksi kakao di Indonesia tahun 2009-2013, departemen Pertanian Republik Indonesia, Jakarta.
- [4] G.A. Wattimena, Nurhaji A.M., Armini Wiendi, Agus Purwito, Darda efendi, Bambang S, Nurul Khumaida. 2011. Bioteknologi dalam pemuliaan tanaman. PT Penerbit IPB Press.
- [5] H.J Eart, R.F. Davis 2003. Effect of drought stress on leaf and whole canopy radiation use effeciainsy and yield of maize. Agron Journal 95:688-696.
- [6] I. Dami, H. Hughes. 1997. Leaf anatomy and water losses of in vitro PEG-treated 'valiant' grape. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 57: 129-132.
- [7] K. Badami, A. Achmad. 2010. Seleksi in vitro untuk toleransi terhadap kekeringan pada jagung (*Zea mays* L.) dengan Polyethylene Glycol (PEG). J.Agrovigor Vol. 3 No.1
- [8] L. Taiz, E. Zeiger. 2002. Plant physiology. California: The Benjamin/Cummings Pub. Co., Inc.
- [9] M. Farid, S. Rinaldi. 2006. Mekanisme ketahanan kedelai terhadap salinitas dan kekeringan berdasarkan karakter morfofisiologis. B.Penelitian. Vol.9 (2), hal.146-153.
- [10] M.Y. Saleem, A.A. Cheema, B.M. Atta. 2005. Induced mutation and in vitro techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). Intl J. Environ. Sci. 2(2): 141-145.
- [11] P. Dewanti, A. Sholeh, I. Cahya. 2009. Seleksi embriosomatik klon kakao unggulan terhadap kekeringan. Ringkasan Eksekutif Hasil-hasil Penelitian.
- [12] R. Yunita. 2009. Pemanfaatan variasi somaklonal dan seleksi in vitro dalam perakitan tanaman toleran cekaman abiotik
- [13] Rahardjo P. 1999. Perkembangan bahan tanam kakao di Indonesia. Warta Pusat Penelitian Kopi dan kakao, 15 (2) 184-189.
- [14] UNCTAD. 2007. Transnational corporations, extrancrive industries and development. World Invesment Report. New York and Geneva.