

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao

2.1.1 Klasifikasi dan asal tanaman

Kakao termasuk famili Malvaceae dan secara ilmiah dikenal sebagai *Theobroma cacao* L. Tanaman ini berasal dari kawasan tropis Amerika dan kemudian dibudidayakan secara luas di daerah tropis. Kakao merupakan tanaman tahunan berkayu dengan sistem perakaran, batang, cabang, daun, bunga, dan buah yang menunjukkan variasi genetik tinggi. Variasi tersebut menjadi sumber penting bagi pemuliaan, tetapi juga menyebabkan keturunan dari biji tidak selalu seragam dengan tanaman induk (Wickramasuriya & Dunwell, 2018).

Klasifikasi tanaman kakao:

Kingdom: Plantae

Divisi: Tracheophyta

Kelas: Magnoliopsida

Ordo: Malvales

Famili: Malvaceae

Genus: *Theobroma*

Spesies: *Theobroma cacao* L.

2.1.2 Morfologi dan pertumbuhan tunas

Kakao memiliki pola pertumbuhan tunas yang khas. Pucuk mengalami periode pertumbuhan aktif atau flushing yang diikuti fase istirahat. Tunas apikal dan nodus mengandung meristem yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber eksplan. Kondisi fisiologis tunas, umur jaringan, kesehatan tanaman induk, posisi eksplan, dan musim pengambilan dapat memengaruhi respons kultur serta tingkat kontaminasi. Penelitian kultur pucuk kakao menunjukkan bahwa stadium fisiologis tunas berkaitan dengan kemampuan pembukaan dan pertumbuhan mata tunas setelah ditanam secara *in vitro* (Orchard et al., 1979).

2.1.3 Perbanyakan tanaman kakao

Perbanyakan kakao dapat dilakukan melalui biji, setek, okulasi, sambung pucuk, dan pendekatan *in vitro*. Perbanyakan melalui biji relatif mudah, tetapi keragaman genetiknya tinggi. Perbanyakan vegetatif mempertahankan karakter klon, tetapi membutuhkan tanaman sumber dan keterampilan teknis. Kultur *in vitro* dapat melengkapi metode konvensional dengan menyediakan sistem multiplikasi, regenerasi, dan konservasi bahan tanaman, meskipun kakao tergolong spesies yang responsnya sangat dipengaruhi genotipe (Garcia et al., 2016; Jones et al., 2022).

2.2 Kultur Jaringan Tanaman

2.2.1 Pengertian dan prinsip totipotensi

Kultur jaringan tanaman merupakan teknik pemeliharaan dan pertumbuhan bagian tanaman pada media nutrisi dalam kondisi terkendali. Dasarnya adalah

totipotensi, yaitu kemampuan sel tanaman untuk mengekspresikan informasi genetiknya dan membentuk struktur atau tanaman lengkap apabila memperoleh kondisi fisiologis dan lingkungan yang sesuai. Dalam penerapannya, respons eksplan ditentukan oleh genotipe, umur fisiologis, jenis organ, komposisi media, zat pengatur tumbuh, cahaya, suhu, dan kondisi aseptik (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018).

2.2.2 Tahapan mikropropagasi

Pemilihan dan persiapan tanaman induk

Tanaman induk dipilih sehat, bebas gejala penyakit, dan memiliki karakter yang diinginkan. Sanitasi tanaman induk dapat menurunkan beban mikroba sebelum eksplan diambil. Tahapan mikropropagasi perlu dikelola sebagai satu sistem karena kegagalan pada tahap awal akan mengurangi efisiensi tahap berikutnya (Abdalla et al., 2022).

Inisiasi kultur aseptik

Eksplan dicuci, disterilisasi permukaan, dipotong, dan ditanam pada media awal. Tahap ini menentukan apakah kultur bebas kontaminasi dan tetap hidup. Tahapan mikropropagasi perlu dikelola sebagai satu sistem karena kegagalan pada tahap awal akan mengurangi efisiensi tahap berikutnya (Abdalla et al., 2022).

Multiplikasi

Eksplan yang berhasil diinisiasi dipacu membentuk tunas atau propagul baru melalui pengaturan media dan zat pengatur tumbuh. Tahapan mikropropagasi perlu dikelola sebagai satu sistem karena kegagalan pada tahap awal akan mengurangi efisiensi tahap berikutnya (Abdalla et al., 2022).

Pengakaran dan pemanjangan

Tunas dipindahkan ke media yang mendukung pembentukan akar dan pertumbuhan planlet. Tahapan mikropropagasi perlu dikelola sebagai satu sistem karena kegagalan pada tahap awal akan mengurangi efisiensi tahap berikutnya (Abdalla et al., 2022).

Aklimatisasi

Planlet dipindahkan dari kondisi *in vitro* yang lembap dan kaya nutrisi menuju lingkungan luar secara bertahap. Tahapan mikropropagasi perlu dikelola sebagai satu sistem karena kegagalan pada tahap awal akan mengurangi efisiensi tahap berikutnya (Abdalla et al., 2022).

2.2.3 Media kultur

Media kultur menyediakan unsur hara makro dan mikro, vitamin, sumber karbon, bahan pemat, dan bila diperlukan zat pengatur tumbuh. Media Murashige dan Skoog banyak digunakan sebagai media dasar karena menyediakan garam mineral dalam komposisi yang mendukung berbagai jenis jaringan tanaman. Media yang sama juga sangat sesuai bagi pertumbuhan mikroorganisme, sehingga kontaminasi dapat berkembang cepat apabila mikroba masuk ke dalam wadah kultur (Murashige & Skoog, 1962; Leifert et al., 1991).

2.3 Kultur *In Vitro* Kakao

Penelitian kultur *in vitro* kakao telah mencakup organogenesis, kultur pucuk, mikrosetek, embriogenesis somatik, dan transformasi genetik. Pucuk serta nodus kakao dapat membentuk tunas dan akar pada media yang sesuai. Traore et

al. (2003) mengembangkan mikropropagasi menggunakan tanaman asal embrio somatik sebagai sumber nodus dan pucuk, sedangkan Passey dan Jones (1983) melaporkan proliferasi serta pengakaran tunas kakao tipe Amelonado pada media yang dimodifikasi.

Embriogenesis somatik menjadi pendekatan yang banyak dikembangkan karena memungkinkan produksi embrio dari jaringan somatik. Berbagai penelitian menggunakan petal, staminodia, dan jaringan embrio somatik sebagai bahan awal. Efisiensi respons berbeda antar genotipe dan dipengaruhi komposisi media, sumber karbon, status fisiologis eksplan, serta kondisi kultur (Li et al., 1998; Ajijah & Hartati, 2016; Ajijah et al., 2016; Guillou et al., 2018; Jones et al., 2022; Priandani et al., 2023).

Walaupun kultur *in vitro* memberi peluang besar bagi perbaikan dan perbanyakan kakao, fase inisiasi tetap menjadi hambatan. Kakao yang tumbuh pada lingkungan tropis lembap dapat berasosiasi dengan beragam mikroorganisme. Eksplan dari tanaman lapang biasanya lebih sulit disterilkan daripada jaringan muda yang ditumbuhkan dalam kondisi terkendali. Hall dan Collin (1975) menekankan bahwa sumber bahan tanaman memengaruhi jumlah eksplan yang dapat digunakan, tingkat kontaminasi, dan kemudahan sterilisasi.

Penelitian di Indonesia juga menunjukkan bahwa keberhasilan kultur kakao dipengaruhi jenis eksplan, genotipe, kondisi media, pencokelatan jaringan, dan pengendalian kontaminasi (Ajijah & Hartati, 2016; Ajijah et al., 2016; Pancaningtyas & Ismayadi, 2011; Priandani et al., 2023).

2.4 Eksplan Tunas Kakao

Eksplan tunas dipilih karena mengandung meristem dan bakal daun yang memiliki potensi organogenik. Tunas yang masih muda umumnya lebih responsif, tetapi jaringan yang lunak juga lebih mudah mengalami cedera akibat bahan sterilan. Tunas dari lapang memiliki permukaan tidak rata, rambut halus, lipatan daun, dan celah pada mata tunas yang dapat melindungi mikroorganisme dari kontak langsung dengan larutan sterilan. Oleh karena itu, pencucian awal, penggunaan surfaktan, konsentrasi sterilan, dan lama perendaman harus dioptimalkan secara terpadu (Sivanesan et al., 2021).

Penelitian pada beberapa jenis eksplan menunjukkan bahwa komposisi, konsentrasi, dan lama paparan bahan sterilan perlu disesuaikan dengan karakter jaringan untuk menekan kontaminasi tanpa meningkatkan kerusakan eksplan (Luri et al., 2021; Lestari et al., 2025).

Kondisi tanaman induk harus dipertimbangkan dalam interpretasi hasil. Tunas yang berasal dari tanaman tidak terawat, terkena hujan, atau berada dekat permukaan tanah dapat memiliki beban kontaminan lebih tinggi. Sebaliknya, pemeliharaan tanaman induk di rumah kaca dan perlakuan sanitasi prapanen dapat mengurangi kontaminasi awal. Informasi tentang klon, umur, posisi tunas, dan kondisi tanaman induk diperlukan agar protokol dapat diulang dengan hasil yang sebanding.

2.5 Kontaminasi dalam Kultur Jaringan

2.5.1 Sumber kontaminasi

Sumber kontaminasi dapat dikelompokkan menjadi eksplan, media, alat, operator, ruang kerja, wadah, dan lingkungan inkubasi. Kontaminan permukaan atau epifit berada pada bagian luar jaringan dan secara teori dapat dikurangi dengan pencucian serta sterilisasi permukaan. Kontaminan endofit berada di dalam jaringan, sehingga dapat bertahan setelah permukaan tampak bersih dan baru berkembang setelah beberapa hari atau pada subkultur berikutnya (Quambusch & Winkelmann, 2018).

Kajian kultur jaringan di Indonesia pada anggrek, porang, dan pisang Cavendish juga melaporkan kontaminasi jamur dan/atau bakteri sebagai masalah penting selama tahap inisiasi dan pemeliharaan kultur (Andriani & Heriansyah, 2021; Khoiriah et al., 2022; Sulichantini et al., 2024).

Kontaminasi yang berasal dari prosedur dapat terjadi karena autoklaf tidak mencapai kondisi yang diperlukan, tutup botol longgar, alat diseksi menyentuh permukaan tidak steril, tangan operator melintas di atas wadah terbuka, atau aliran udara laminar tidak berfungsi baik. Pengendalian kontaminasi karena itu harus mencakup standardisasi seluruh alur kerja, bukan hanya peningkatan konsentrasi bahan sterilan pada eksplan (Abdalla et al., 2022).

2.5.2 Kontaminasi jamur

Kontaminasi jamur umumnya tampak sebagai miselium menyerupai kapas, benang halus, koloni berbulu, atau massa berwarna putih, abu-abu, hijau, coklat,

maupun hitam. Jamur dapat menyebar cepat di atas permukaan media dan eksplan. Spora yang melekat pada lipatan jaringan atau terbawa udara dapat menjadi sumber kontaminasi. Akan tetapi, pengamatan warna dan tekstur koloni hanya memadai untuk pengelompokan awal dan tidak dapat digunakan sebagai identifikasi spesies.

2.5.3 Kontaminasi bakteri

Kontaminasi bakteri sering tampak sebagai lapisan berlendir, koloni basah, perubahan kejernihan media, cairan keruh, atau massa berwarna putih, krem, atau kekuningan di sekitar eksplan. Beberapa bakteri tumbuh sangat cepat, sedangkan bakteri endofit dapat menunjukkan gejala terlambat atau bahkan tidak menimbulkan koloni jelas. Kontaminasi bakteri yang tidak terlihat dapat memengaruhi fisiologi tanaman dan menyesatkan interpretasi hasil kultur (Moreno-Vázquez et al., 2014).

2.5.4 Dampak kontaminasi

Mikroorganisme berkompetisi dengan eksplan dalam memanfaatkan nutrisi dan dapat menghasilkan toksin, enzim, asam organik, atau senyawa lain yang mengubah lingkungan kultur. Kontaminasi mengurangi jumlah kultur layak, meningkatkan biaya bahan dan tenaga, serta menurunkan keterulangan penelitian. Pada sistem produksi komersial, satu sumber kontaminasi dapat menyebar melalui subkultur dan menyebabkan kehilangan banyak propagul (Leifert et al., 1991).

2.6 Sterilisasi Permukaan dan Alkohol

2.6.1 Prinsip sterilisasi permukaan

Istilah sterilisasi permukaan dalam kultur jaringan biasanya merujuk pada perlakuan disinfeksi yang menurunkan atau menghilangkan mikroorganisme pada permukaan eksplan. Tujuan utamanya bukan hanya memperoleh eksplan bebas kontaminasi, tetapi juga mempertahankan jaringan tetap hidup dan mampu tumbuh. Prosedur lazim meliputi pencucian dengan air dan deterjen, pembilasan, perlakuan alkohol, perlakuan oksidator seperti natrium hipoklorit, serta pembilasan berulang menggunakan akuades steril (Sivanesan et al., 2021).

2.6.2 Mekanisme kerja alkohol

Alkohol bekerja terutama melalui denaturasi protein dan gangguan membran sel mikroorganisme. Kehadiran air mendukung penetrasi dan proses denaturasi, sehingga efektivitas alkohol tidak meningkat secara linier sampai konsentrasi absolut. Dalam kultur jaringan, alkohol sering digunakan dalam paparan singkat karena dapat menghilangkan lapisan lilin, membantu pembasahan permukaan, dan menurunkan jumlah mikroba, tetapi paparan berlebihan dapat merusak jaringan tanaman (McDonnell & Russell, 1999).

2.6.3 Konsentrasi dan lama kontak

Efektivitas larutan sterilan ditentukan oleh konsentrasi, lama kontak, suhu, bahan organik, jenis mikroorganisme, dan struktur permukaan eksplan. Konsentrasi lebih tinggi dapat meningkatkan tekanan antimikroba, tetapi juga meningkatkan risiko fitotoksisitas. Karena respons setiap spesies dan organ

berbeda, protokol yang efektif pada biji belum tentu sesuai untuk tunas, daun, atau bunga. Optimasi harus menilai sterilitas bersama dengan kelangsungan hidup, pencokelatan, pembukaan tunas, dan pertumbuhan lanjutan (Luri et al., 2021; Lestari et al., 2025).

2.7 Waktu Muncul Kontaminasi

Waktu muncul kontaminasi (WMK) adalah jumlah hari sejak inokulasi sampai gejala kontaminasi pertama terlihat. Parameter ini melengkapi persentase kontaminasi akhir. Dua perlakuan dapat menghasilkan persentase kontaminasi yang sama, tetapi perlakuan yang menunda kemunculan kontaminasi mungkin menurunkan beban awal mikroba atau memperlambat pertumbuhannya. WMK harus dicatat setiap hari dengan kriteria visual yang konsisten dan hanya dihitung pada unit yang benar-benar mengalami kontaminasi.

Interpretasi WMK harus hati-hati. Kontaminasi awal tidak selalu hanya disebabkan eksplan, karena kesalahan penanaman juga dapat menghasilkan gejala cepat. Sebaliknya, kontaminasi lambat dapat berasal dari mikroba endofit atau kontaminan yang mengalami fase adaptasi. Oleh sebab itu, WMK sebaiknya dikaitkan dengan jenis kontaminan, posisi koloni, kondisi eksplan, dan riwayat penanganan kultur.

2.8 Kerangka Pemikiran

Eksplan tunas kakao dapat membawa beban mikroba yang berbeda-beda. Perlakuan alkohol 40%, 50%, dan 60% memberikan tekanan antimikroba yang berbeda. Peningkatan konsentrasi diperkirakan menurunkan jumlah unit

terkontaminasi dan memperlambat WMK, tetapi hasil sterilitas perlu ditafsirkan bersama risiko cedera jaringan. Karena penelitian ini tidak mengamati viabilitas dan pertumbuhan, kesimpulan dibatasi pada sterilitas, kontaminasi, WMK, dan jenis kontaminan visual.

Beban mikroba eksplan → Perlakuan alkohol 40%, 50%, dan 60% → Penurunan mikroorganisme permukaan → Sterilitas/kontaminasi akhir + WMK + jenis kontaminan visual

2.9 Hipotesis

1. Peningkatan konsentrasi alkohol dari 40% menjadi 60% diduga meningkatkan persentase eksplan steril dan menurunkan kontaminasi akhir.
2. Peningkatan konsentrasi alkohol cenderung memperlambat waktu muncul kontaminasi.
3. Kontaminasi bakteri dan jamur menunjukkan proporsi yang berbeda pada setiap perlakuan.