



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**KULTUR IN VITRO TANAMAN *Theobroma cacao* DENGAN
VARIASI POLIETILEN GLIKOL (PEG) 6000 DAN POTENSINYA
UNTUK PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER KATEKIN**

SKRIPSI



**AHMAD FAKHRI
04 132 076**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2010**

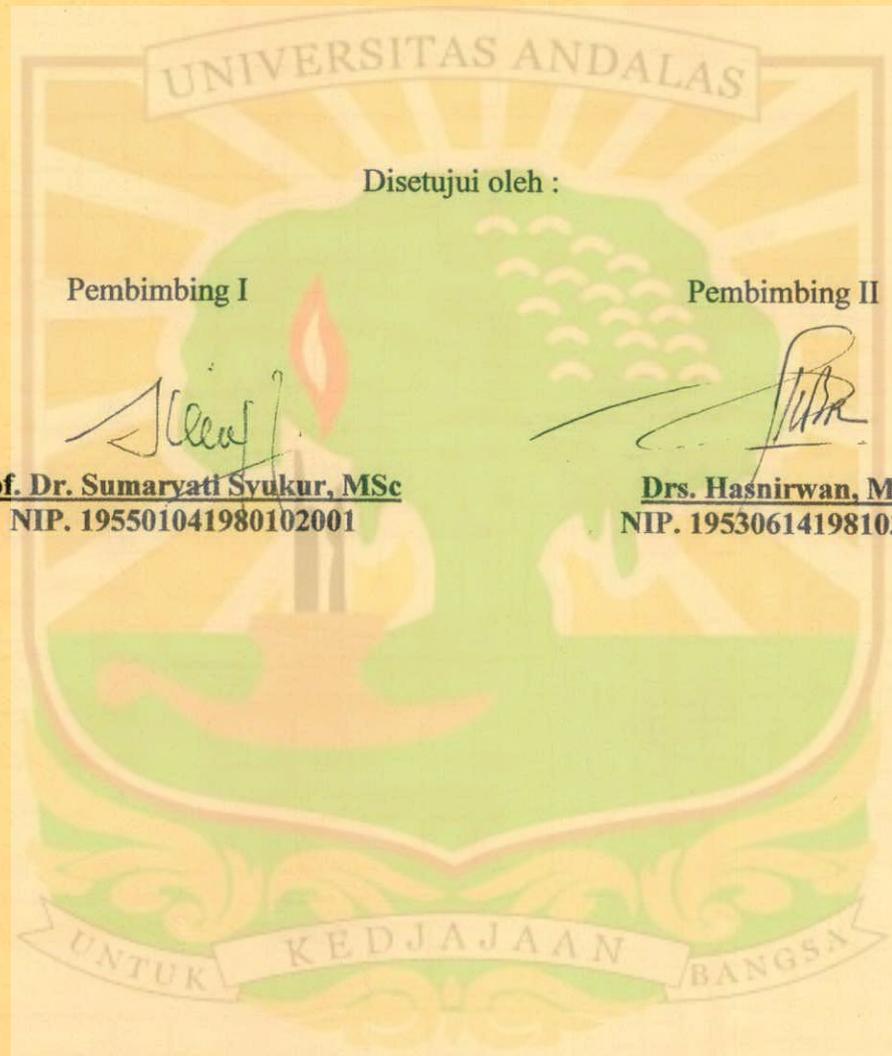
**KULTUR *IN VITRO* TANAMAN *Theobroma cacao* DENGAN VARIASI
POLIETILEN GLIKOL (PEG) 6000 DAN POTENSINYA UNTUK
PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER KATEKIN**



**Skripsi ini diajukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains
pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Andalas**

**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2010**

Kultur *in vitro* tanaman *Theobroma cacao* dengan variasi polietilen glikol (PEG) 6000 dan potensinya untuk produksi metabolit sekunder katekin, skripsi oleh Ahmad Fakhri (No.BP. 04132076) sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas Padang.



ABSTRACT

***IN VITRO* CULTURE OF *Theobroma cacao* PLANT WITH POLYETHYLENE GLYCOL (PEG) 6000 AND ITS POTENTIALS FOR SECONDARY METABOLITE OF CATECHIN PRODUCTION**

By:

Ahmad Fakhri

Bachelor of Science in Chemistry Faculty of Mathematic and Natural Science
University of Andalas

Advised by: Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M.Sc and Drs. Hasnirwan, M. Si

Study about *Theobroma cacao in vitro* culture with polyethylene glycol (PEG) 6000 variation and its potentials for secondary metabolite of catechin production had been done. The aim of this study is to know at what PEG concentration could increase the growth and secondary metabolite production of *T. cacao*, and quantitative assay for *T. cacao* secondary metabolite of catechin that had been given some PEG concentration. This study used Complete Random Test with 5 treatment and 3 repetition. PEG concentration variation were added into *T. cacao* treatment medium as treatment. The result showed at PEG with 0,5% concentration gave highest average for wet weight. The highest secondary metabolite of catechin production was obtained at addition of PEG with 1% concentration.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT, atas berkat dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Kultur *in vitro* tanaman *Theobroma cacao* dengan variasi polietilen glikol (PEG) 6000 dan potensinya untuk produksi metabolit sekunder katekin”**.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas, Padang.

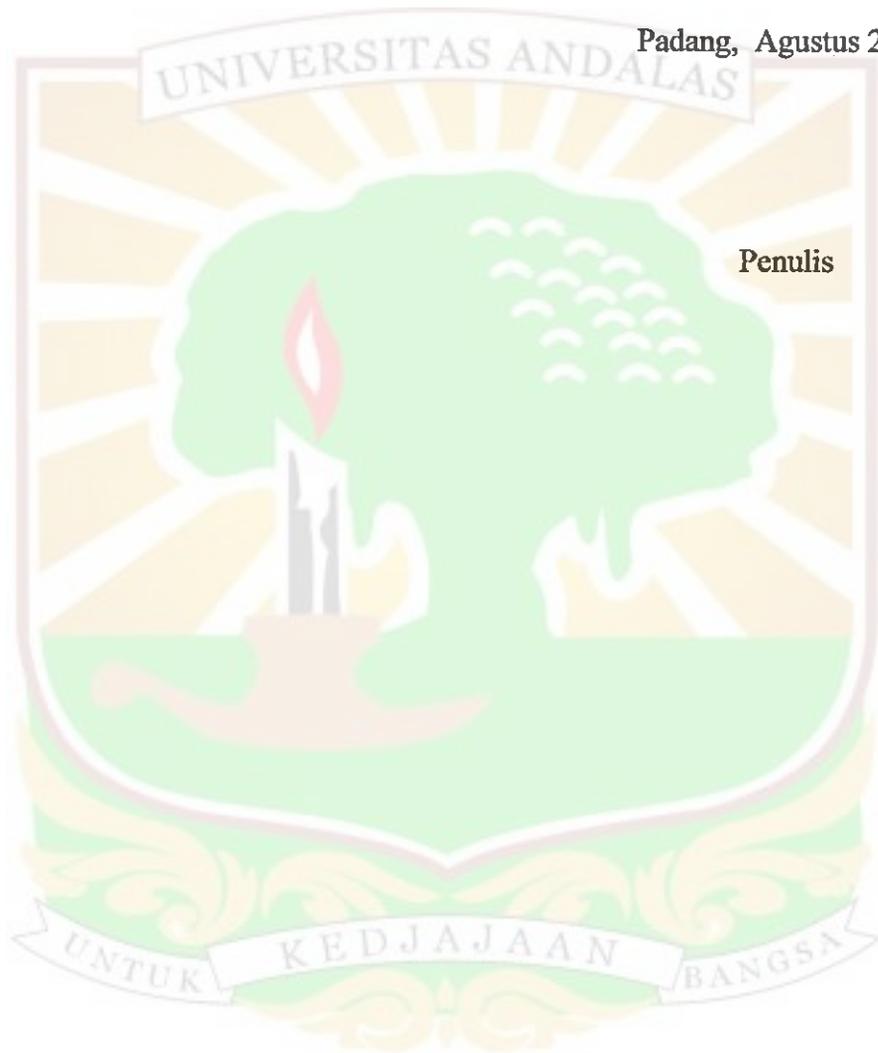
Pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan memberikan dorongan dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini, terutama kepada :

1. Bapak Dr. H. Djaswir Darwis, MSDEA selaku Ketua Jurusan Kimia, FMIPA UNAND
2. Ayahanda dan Ibunda tercinta yang selalu memberikan semangat dan dukungan penuh dalam setiap langkah yang “ku lalui”.
3. Ibu Prof. Dr Sumaryati Syukur, M. Sc sebagai pembimbing I yang telah mengarahkan dan membimbing penulis dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Bapak Hasnirwan, MSi sebagai pembimbing II yang telah mengarahkan dan membimbing penulis dalam melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
5. Seluruh dosen di Jurusan Kimia Universitas Andalas yang telah mendidik dan memberikan ilmu selama perkuliahan.
6. Seluruh analis yang telah membantu dalam penelitian.
7. Rekan-rekan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Namun demikian, penulis menyadari dalam skripsi ini masih terdapat kekurangan dan jauh dari kesempurnaan. Untuk itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang sifatnya membangun guna penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

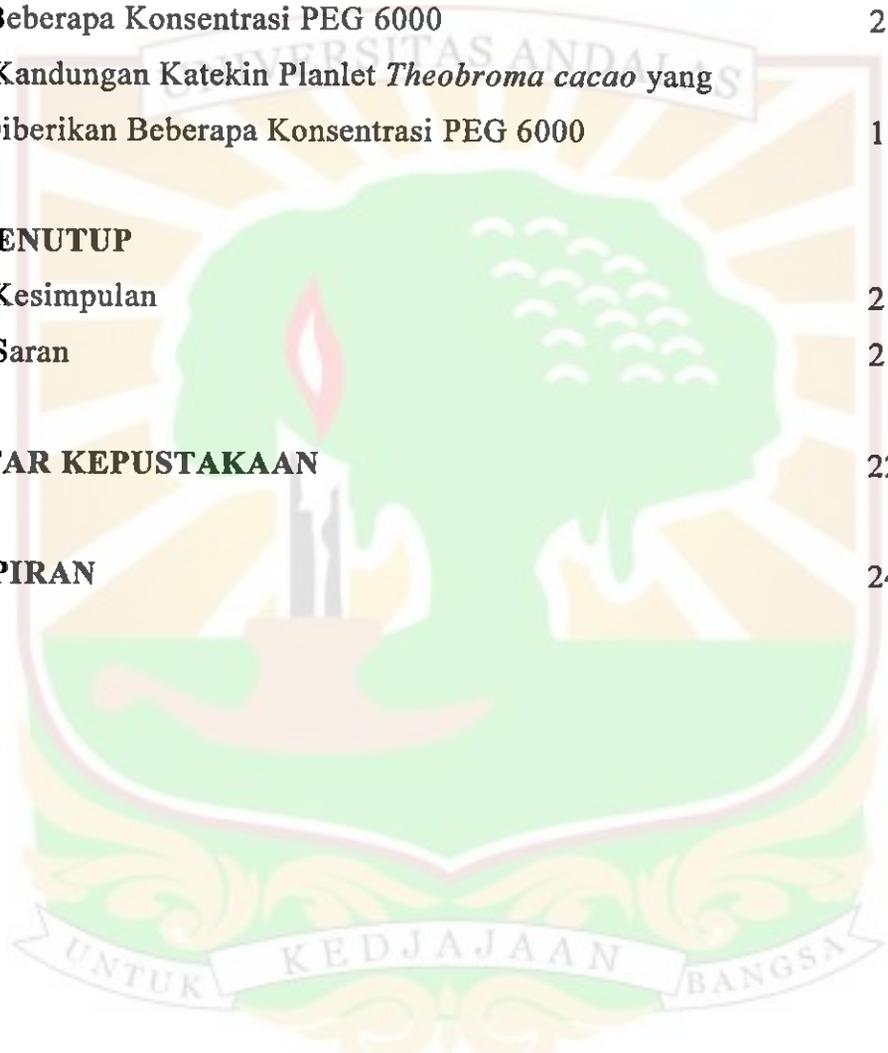
Padang, Agustus 2010



DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	2
1.3. Tujuan Penelitian dan Manfaat Penelitian	3
1.4. Hipotesis Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan Umum Tanaman Cokelat	4
2.2. Metabolit Sekunder	6
2.3. Teknik Kultur Jaringan Untuk Peningkatan Metabolit Sekunder	9
III. METODOLOGI PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2 Metode Penelitian	13
3.3 Alat dan Bahan	13
3.3.1 Alat	13
3.3.2 Bahan	13
3.4 Prosedur Penelitian	13
3.4.1 Sterilisasi alat	13
3.4.2 Pembuatan larutan stok medium MS	14

3.4.3 Pembuatan medium MS dengan variasi konsentrasi PEG	14
3.4.4 Persiapan Eksplan	14
3.4.5 Pengamatan	15
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Bobot Basah Planlet <i>Theobroma cacao</i> yang Diberikan Beberapa Konsentrasi PEG 6000	21
4.2 Kandungan Katekin Planlet <i>Theobroma cacao</i> yang Diberikan Beberapa Konsentrasi PEG 6000	18
V. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	21
5.2 Saran	21
DAFTAR KEPUSTAKAAN	22
LAMPIRAN	24



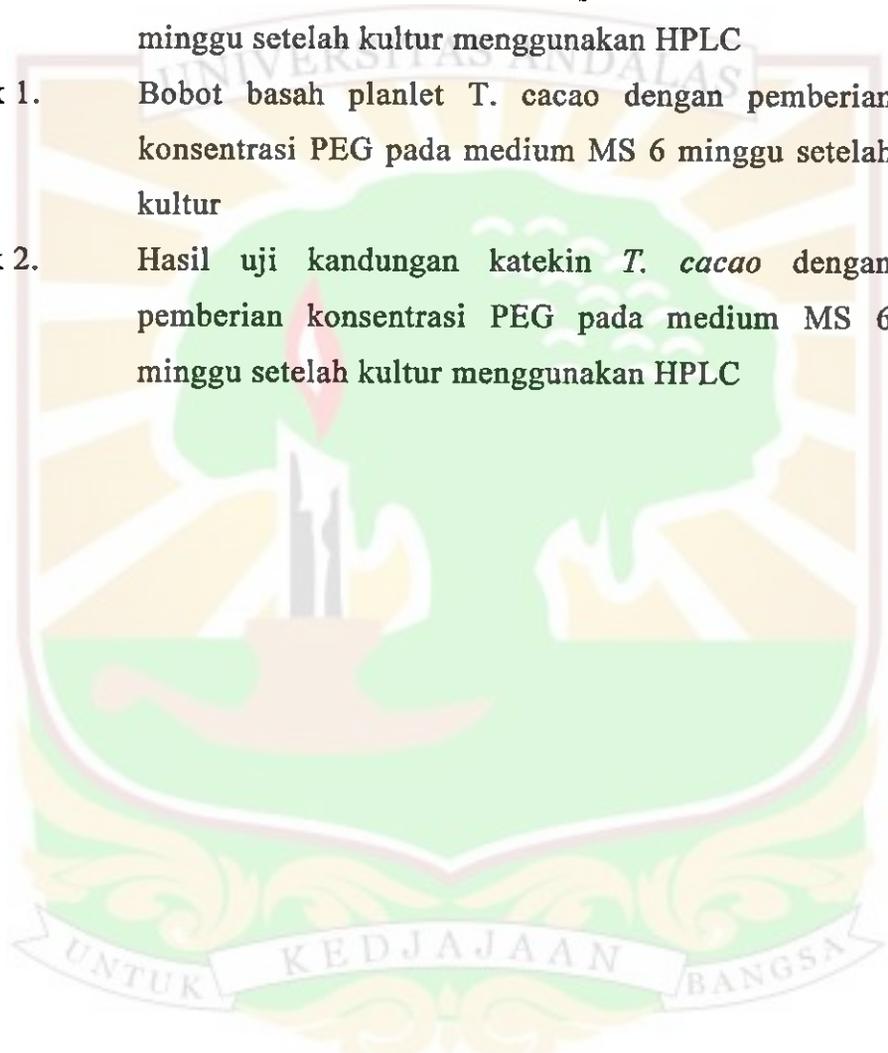
DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Tanaman <i>Theobroma cacao</i>	5
Gambar 2.	Skema jalur biosintesis katekin	8
Gambar 3.	Diagram klasifikasi golongan flavanoid	9
Gambar 4.	Rumus bangun polietilen glikol	12



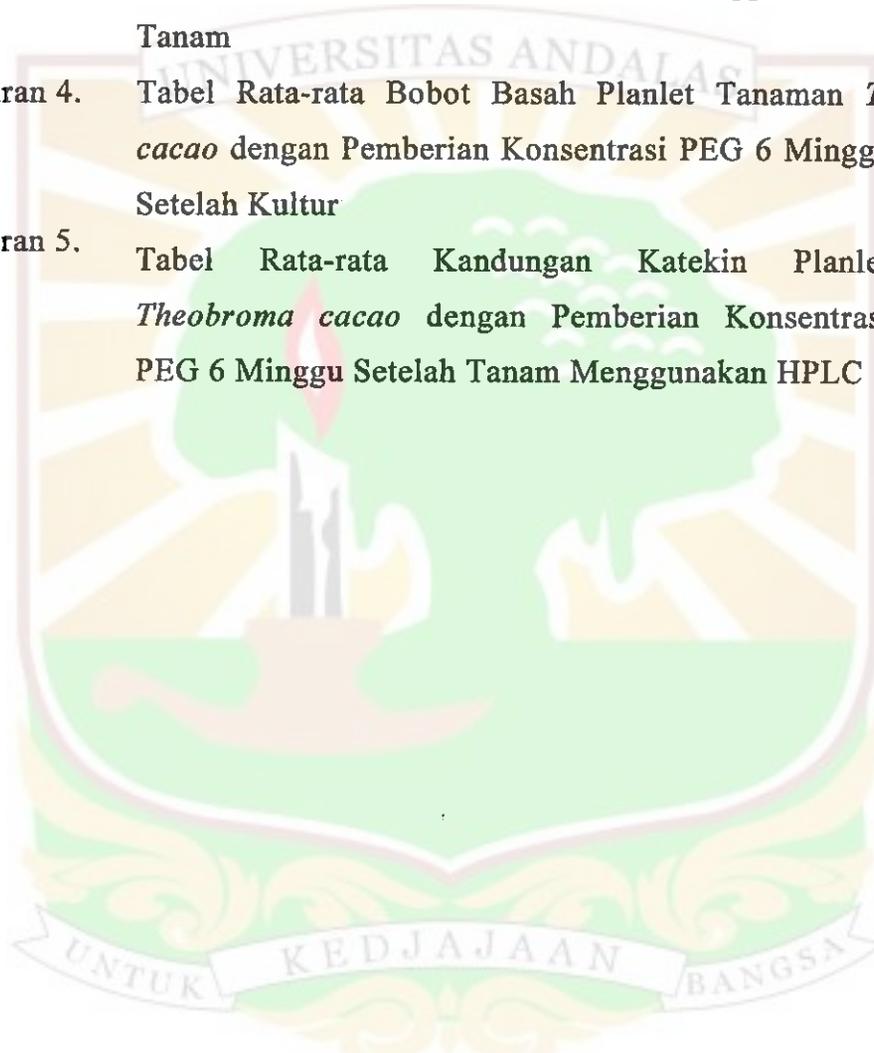
DAFTAR TABEL DAN GRAFIK

Tabel 1.	Bobot basah planlet <i>T. cacao</i> dengan pemberian konsentrasi PEG pada medium MS 6 minggu setelah kultur	16
Tabel 2.	Hasil uji kandungan katekin <i>T. cacao</i> dengan pemberian konsentrasi PEG pada medium MS 6 minggu setelah kultur menggunakan HPLC	18
Grafik 1.	Bobot basah planlet <i>T. cacao</i> dengan pemberian konsentrasi PEG pada medium MS 6 minggu setelah kultur	17
Grafik 2.	Hasil uji kandungan katekin <i>T. cacao</i> dengan pemberian konsentrasi PEG pada medium MS 6 minggu setelah kultur menggunakan HPLC	19



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi Medium Murashige & Skoog (MS)	24
Lampiran 2.	Proses Penanaman Eksplan Embrio <i>T. cacao</i> Pada Pedium MS	25
Lampiran 3.	Gambar Planlet <i>T.cacao</i> dengan Pemberian Konsentrasi PEG pada Medium MS 6 Minggu Setelah Tanam	26
Lampiran 4.	Tabel Rata-rata Bobot Basah Planlet Tanaman <i>T. cacao</i> dengan Pemberian Konsentrasi PEG 6 Minggu Setelah Kultur	27
Lampiran 5.	Tabel Rata-rata Kandungan Katekin Planlet <i>Theobroma cacao</i> dengan Pemberian Konsentrasi PEG 6 Minggu Setelah Tanam Menggunakan HPLC	28



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan tanaman dari kelas *Dicotyledonae*. Tanaman ini digolongkan ke dalam kelompok tanaman *caulifloris*. Biji kakao dan produknya (*cocoa liquor*, *cocoa powder*, dan *dark chocolate*) merupakan sumber makanan yang kaya dengan senyawa fenolik. Biji kakao mempunyai kandungan fenolik yang tinggi sekitar 12-18% (berat kering) dalam bijinya yang belum difermentasi.⁴ Senyawa ini mempunyai kemampuan untuk melawan radikal bebas yang berbahaya bagi sistem pencernaan dan tubuh. Fenolik atau polifenol mendapatkan perhatian yang tinggi oleh dunia karena fungsi fisiologisnya dapat sebagai antioksidan, antimutagenik, dan antitumor. Polifenol terbesar berasal dari senyawa flavonoid.¹

Bioteknologi menawarkan metoda yang efisien seperti teknik kultur sel dan kultur jaringan tanaman. Metode kultur jaringan dikembangkan untuk membantu memperbanyak tanaman, khususnya untuk mikropropagasi. Bibit yang dihasilkan dari kultur jaringan mempunyai beberapa keunggulan, antara lain: mempunyai sifat yang identik dengan induknya, dapat diperbanyak dalam jumlah yang besar sehingga tidak terlalu membutuhkan tempat yang luas, mampu menghasilkan bibit dengan jumlah besar dalam waktu yang singkat, kesehatan dan mutu bibit lebih terjamin, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibandingkan dengan perbanyakan konvensional².

Dengan berkembangnya bioteknologi tanaman khususnya teknologi kultur *in vitro*, teknik perbanyakan tanaman makin luas dan dapat dilakukan dalam waktu lebih singkat. Teknik kultur *in vitro* merupakan dasar pengetahuan yang mendorong berkembangnya teknik kultur sel, jaringan dan organ tanaman secara *in vitro* dalam kondisi aseptik dan steril dalam laboratorium. Teknik ini merupakan terobosan dalam program pemuliaan tanaman sehingga penyediaan bibit tanaman dapat ditingkatkan baik kuantitas maupun kualitasnya.

Kendala yang dihadapi dalam kultur jaringan kakao selama ini adalah produksi kalus, fenol dan lendir yang berlebihan dari eksplan jaringan vegetatif sehingga menghambat proses regenerasi. Dengan penggunaan embrio sebagai

sumber eksplan, kendala tersebut dapat diatasi. Disamping itu kultur *T. cacao* belum pernah berhasil membentuk planlet kecuali dari embrio.

Produktivitas tumbuhan dalam menghasilkan metabolit sekunder dapat ditingkatkan dengan beberapa cara, yaitu mengoptimasi faktor fisiologis lingkungan hidup sel diantaranya memanipulasi nutrisi media tumbuh, zat pengatur tumbuh, prekursor dan elisitor untuk sintesis metabolit sekunder.³ Pemberian elisitor adalah salah satu strategi yang banyak digunakan dalam memanipulasi peningkatan kandungan metabolit sekunder. Elisitor akan memberikan efek cekaman pada tanaman sehingga meningkatkan metabolit sekunder yang ada pada tanaman. Peningkatan metabolit sekunder pada tanaman tergantung dari konsentrasi elisitor yang diberikan dan jenis tanamannya.⁴ Elisitor dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder dengan dua cara, yaitu meningkatkan aktivitas enzim dan meningkatkan sintesis enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis metabolit tertentu.⁵

PEG merupakan salah satu elisitor karena bisa menimbulkan stress osmosis pada tanaman. PEG adalah senyawa yang dapat menurunkan potensial osmotik larutan melalui aktivitas matriks sub-unit etilena oksida yang mampu mengikat molekul air dengan ikatan hidrogen. Karena turunnya potensial osmotik larutan, air yang ada pada medium tidak bisa diserap oleh tanaman sehingga tanaman mengalami stress osmosis yang dicirikan dengan dihasilkannya prolin, yaitu senyawa osmolit untuk mempertahankan keseimbangan tekanan turgor sel.⁶

Mengingat besarnya potensi tanaman *T. cacao* serta belum adanya informasi mengenai peningkatan kandungan katekin tumbuhan ini dengan penggunaan elisitor, maka dilakukanlah penelitian mengenai kultur *in vitro* tanaman *T. cacao* dengan memvariasikan konsentrasi PEG yang ditambahkan ke dalam medium.

1.2 Perumusan Masalah

Adapun perumusan masalah pada penelitian ini adalah : Apakah dengan penambahan PEG dapat meningkatkan pertumbuhan embrio dan produksi metabolit sekunder pada *T. cacao*.

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

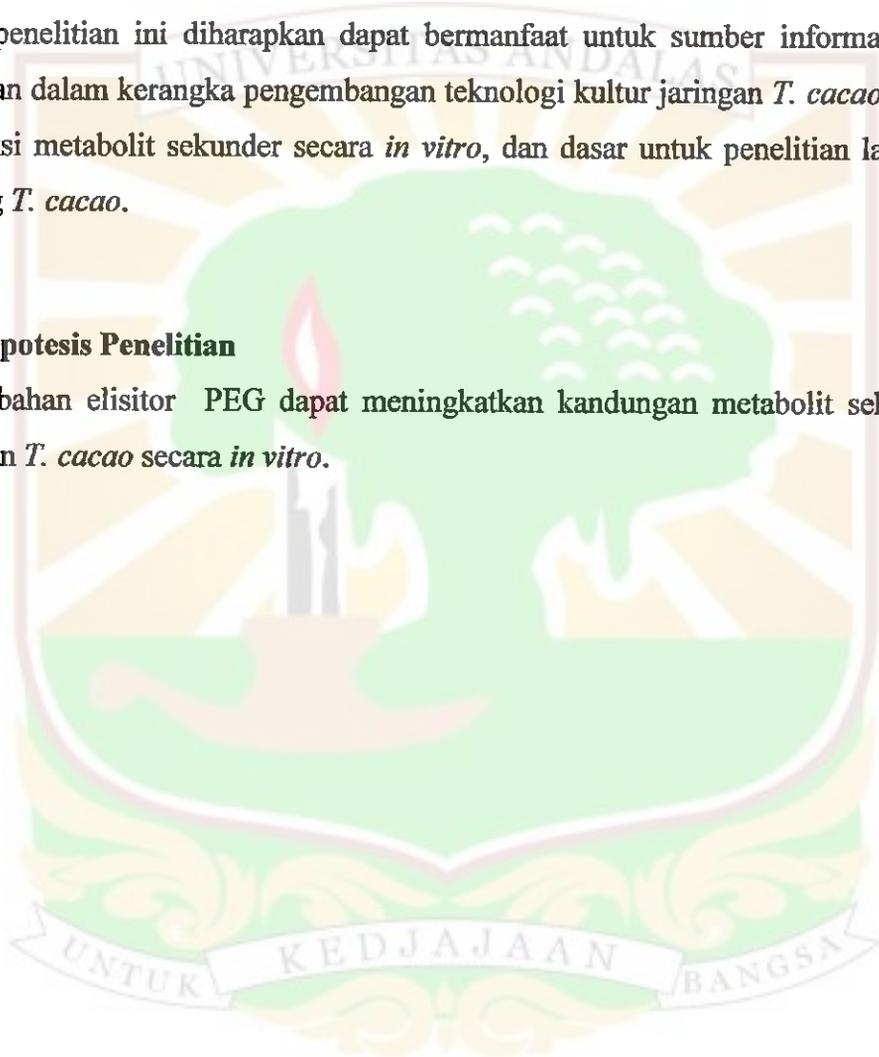
Berdasarkan rumusan permasalahan yang dikemukakan di atas, maka tujuan penelitian ini adalah untuk :

- 1) Mengetahui pada konsentrasi berapa PEG dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder pada *T. cacao*.
- 2). Menguji secara kuantitatif kandungan metabolit sekunder katekin pada planlet *T. cacao* yang diberi perlakuan beberapa konsentrasi PEG.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk sumber informasi dan landasan dalam kerangka pengembangan teknologi kultur jaringan *T. cacao* untuk produksi metabolit sekunder secara *in vitro*, dan dasar untuk penelitian lanjutan tentang *T. cacao*.

1.4 Hipotesis Penelitian

Penambahan elisitor PEG dapat meningkatkan kandungan metabolit sekunder tanaman *T. cacao* secara *in vitro*.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum Tanaman Cokelat

Kakao (*Theobroma cacao*) merupakan tanaman yang menumbuhkan bunga dari batang atau cabang. Karena itu tanaman ini digolongkan ke dalam kelompok tanaman *caulifloris*. Pertumbuhan batang kakao bisa mencapai ketinggian 8-10 m dari pangkal batangnya pada permukaan tanah. Diawal pertumbuhannya tanaman kakao yang diperbanyak melalui biji akan menumbuhkan batang utama sebelum menumbuhkan cabang-cabang primer. Adapun taksonomi tanaman kakao adalah sebagai berikut :

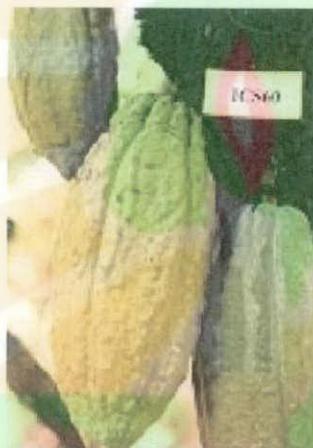
Divisio	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisio	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Sub kelas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Malvales</i>
Famili	: <i>Sterculiaceae</i>
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> Linn. ⁷

Kakao dapat dibagi atas tiga kelompok besar dan jenis tersebut yang terbanyak dibudidayakan, yaitu :

1. *Criollo*, atau yang dikenal juga dengan kakao varietas hijau merupakan tanaman kakao yang pertumbuhannya kuat, daya hasil rendah, relatif gampang terserang hama dan penyakit. Permukaan kulit buah kasar, berbenjol-benjol dan alur-alurnya jelas. Kulit buah tebal tapi lunak, sehingga mudah dipecah. Kadar lemak biji rendah, ukuran biji besar, bentuknya bulat dan mempunyai cita rasa khas yang baik sehingga dikenal sebagai kakao mulia, fine flavour cocoa, chiced cocoa atau edel cocoa.
2. *Forestero*, atau yang disebut juga dengan kakao varietas merah merupakan tanaman kakao yang pertumbuhannya kuat dan cepat, daya hasil tinggi,

relatif tahan terhadap hama dan penyakit. Permukaan kulit buah relative halus karena alur-alurnya dangkal. Kulit buah tipis tetapi keras (liat).kadar lemak tinggi, bentuk biji lonjong (oval), pipih, dan keping biji berwarna ungu gelap. Forestero menghasilkan kakao bermutu sedang dan dikenal sebagai ordinary cocoa, bulk cocoa atau kakao lindak.

3. *Trinitario*, merupakan tanaman kakao hibrid alami dari *Criollo* dan *Forestero*, sehingga menghasilkan biji kakao yang dapat termasuk fine flavour cocoa atau bulk cocoa. Jenis *Trinitario* yang banyak ditanam di Indonesia adalah Hibrid Djati Runggo (DR) dan Uppertimazone Hybrida (Kakao lindak).⁸



(a)



(b)



(c)

Gambar 1. Tanaman *Theobroma cacao*. (a) Jenis Criollo, (b) Jenis Trinitario, (c) Jenis Forastero

Tanaman kakao merupakan tanaman tahunan berupa pohon dengan percabangan rendah dan tajuk biasanya dipelihara setinggi 3-5 m. Akarnya tergolong akar tunggang (*radix primaria*). Pertumbuhan akar bisa mencapai 8 m ke arah samping dan 15 meter ke arah bawah. Tanaman yang diperbanyak dengan cara vegetatif pada awal pertumbuhannya tidak memiliki akar tunggang, melainkan akar serabut yang jumlah akarnya banyak. Setelah dewasa tanaman tersebut memiliki 2 akar yang menyerupai akar tunggang.⁹ Perkembangan akar kakao sangat dipengaruhi oleh struktur tanah. Pada drainase tanah yang buruk, akar tunggang akan tumbuh panjang dan akar lateral masuk jauh ke dalam tanah. Tempat tumbuh yang baik untuk akar tanaman kakao adalah antara 30-50 cm kedalam tanah.¹⁰

2.2 Metabolit Sekunder

Proses metabolisme dalam tumbuhan menghasilkan dua kelompok senyawa yang digolongkan atas metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan, sedangkan metabolit sekunder bukan hanya merupakan kebutuhan pokok untuk hidup dan tumbuh, namun dapat berfungsi sebagai nutrisi darurat untuk bertahan hidup. Metabolit sekunder merupakan senyawa spesifik yang dihasilkan beberapa tumbuhan dan banyak dijumpai dalam bentuk alkaloid, flavanoid, steroid, kumarin, glikosida terpenoid, dan lain-lain.¹¹ Senyawa metabolit sekunder merupakan bagian dari metabolisme sel tumbuhan yang umumnya dihasilkan pada fase pertumbuhan tertentu oleh sel tanaman atau jaringan tertentu pada tanaman, dan metabolit sekunder merupakan komponen-komponen senyawa kimia yang umumnya aktif terhadap bakteri dan virus.¹² Saat ini metabolit sekunder banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang antara lain bidang kedokteran atau farmasi, industri makanan dan minuman, pemberi cita rasa, pewangi, pewarna bahan, insektisida, industri kosmetik dan industri pertanian.

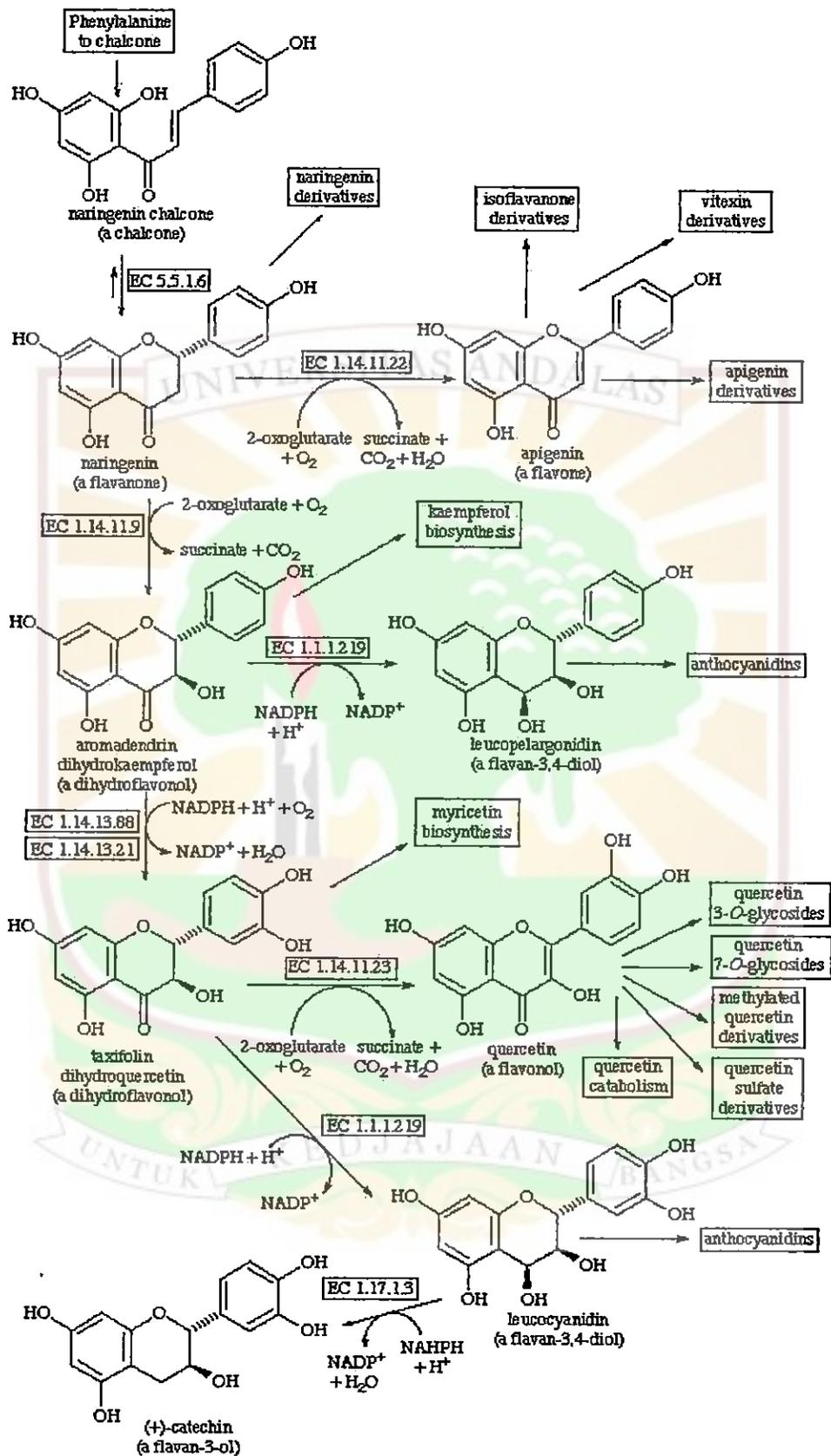
Secara alami peranan dan fungsi metabolit sekunder pada tanaman digunakan sebagai : 1) sistem pertahanan kimia melawan patogen tanaman (virus, jamur dan bakteri), 2) sistem pertahanan terhadap herbivora, molusca,

arthropoda, dan vertebrata, 3) sistem pertahanan terhadap tanaman lain melalui allelopati, 4) antraktan kimia bagi serangga dan hewan yang membantu polinasi serta penyebaran biji.¹³

Fenolik atau polifenol mendapatkan perhatian yang tinggi oleh dunia karena fungsi fisiologisnya yang dapat berfungsi sebagai antioksidan, antimutagenik dan antitumor.⁹ Flavanoid merupakan golongan fenolik terbesar. Hal ini didukung oleh Smith (1972) yang menyatakan bahwa sekitar 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tumbuhan (kira-kira 1×10^9 ton/tahun) diubah menjadi flavonoid, sebagian besar tanin pun berasal dari flavonoid. Jadi flavonoid merupakan golongan fenol alam yang terbesar.

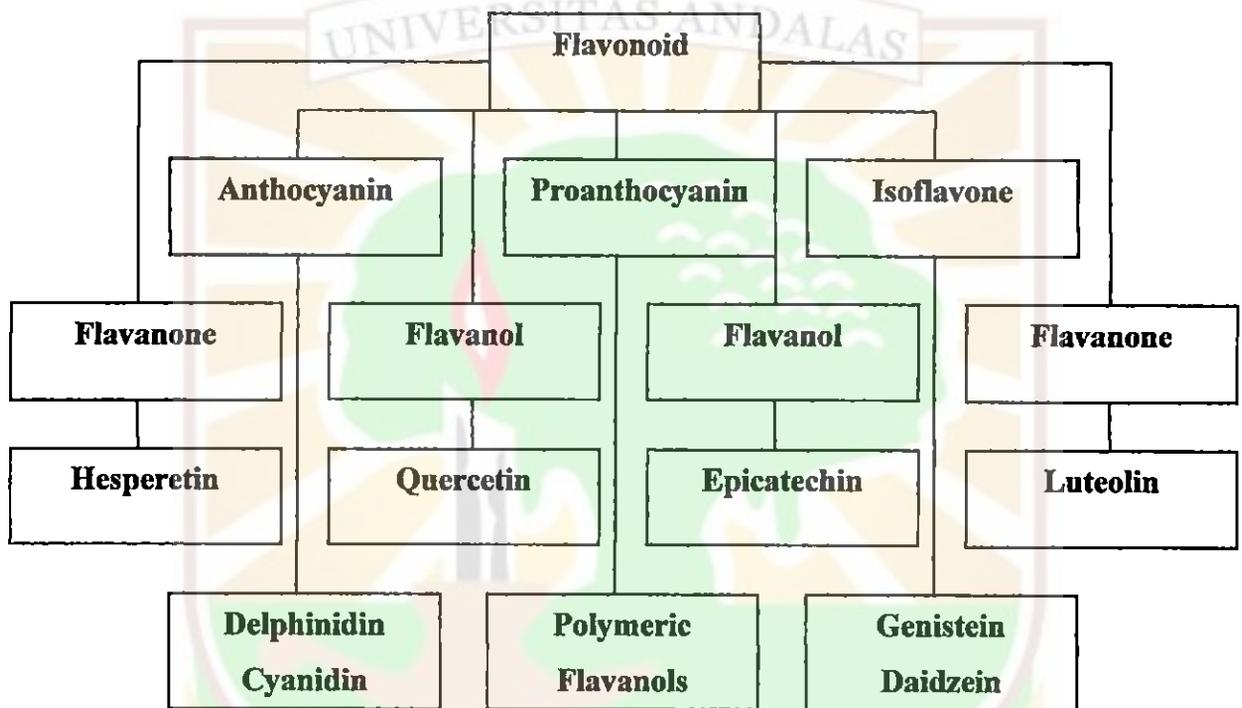
Salah satu senyawa metabolit sekunder yang termasuk dalam struktur flavanoid adalah katekin. Katekin biasanya disebut juga dengan asam katekoat sedangkan rumus kimia $C_{15}H_{14}O_6$ dan termasuk turunan dihidroflavanol. Katekin merupakan senyawa yang tidak berwarna, dalam keadaan murni sedikit tidak larut dalam air dingin tetapi sangat larut dalam air panas, alcohol dan etil asetat. Katekin hampir tidak larut dalam kloroform, benzen dan eter. Katekin terbentuk dari biosintesis flavanoid yang diturunkan dari dua jalur yang terpisah yaitu jalur sikimat dan asetat malonat. Setelah kedua jalur ini bertemu, terbentuk senyawa flavanoid yang pertama kali yaitu khalkon. Bentuk katekin dan senyawa flavanoid lainnya diturunkan dari senyawa ini (Gambar 2).

Semua flavonoid mempunyai struktur yang saling berkaitan karena mempunyai jalur biosintesis yang sama, yaitu melalui jalur sikimat dan jalur asetat malonat. Flavonoid pertama dihasilkan setelah kedua jalur tersebut bertemu. Flavonoid yang dianggap pertama kali muncul adalah khalkon, dan semua bentuk lain diturunkan dari struktur tersebut (Gambar 3).



Gambar 2. Skema jalur biosintesis katekin

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau kecuali alga dan *hornwort*. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, tepung sari, nektar, bunga, buah buni, dan biji. Hanya sedikit yang melaporkan adanya flavonoid pada hewan, misalnya dalam 'propolis' (sekresi lebah), dan didalam sayap-kupu, itupun dengan anggapan bahwa flavonoid tersebut berasal dari tumbuhan yang dimakan hewan tersebut dan tidak dibiosintesis didalam tubuh mereka.¹⁴



Gambar 3. Diagram Klasifikasi Golongan Flavanoid

2.3 Teknik Kultur Jaringan Untuk Peningkatan Metabolit Sekunder

Kultur jaringan merupakan suatu metoda untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan dan organ, serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptis sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenasi menjadi tanaman yang utuh kembali.¹⁵ Selain untuk perbanyak tanaman, teknik ini juga dapat digunakan untuk perbaikan sifat tanaman, seperti menghasilkan tanaman bebas virus, produksi metabolit sekunder dan preservasi tanaman.¹⁶ Teori yang mendasari teknik ini adalah

adanya konsep totipotensi pada sel tumbuhan, dimana sel yang hidup memiliki kemampuan untuk bereproduksi, membentuk organ dan berkembang menjadi individu yang sempurna jika ditempatkan pada lingkungan yang sesuai untuk pertumbuhannya.²

Keuntungan dari teknik kultur jaringan ini adalah dapat mempersingkat waktu dalam perbanyak tanaman untuk dieksploitasi secara massal guna kepentingan komersial, dihasilkannya bibit dalam jumlah banyak dan bermutu, sifat tanaman yang dihasilkan seragam dan sama dengan induknya.¹⁷ Keuntungan lainnya kesehatan bibit lebih terjamin karena bebas dari kontaminasi mikroba penyebab penyakit, kecepatan tumbuh bibit lebih cepat dibandingkan dengan cara konvensional, dan proses metabolismenya dapat diatur secara rasional.¹⁸

Keberhasilan metoda kultur jaringan dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu unsur hara, zat pengatur tumbuh, faktor fisik dan eksplan. Medium merupakan media tumbuh bagi eksplan dan sebagai penyedia nutrisi bagi pertumbuhan eksplan pada kultur jaringan.² Media kultur jaringan tidak hanya menyediakan unsur hara makro (N, P, K, Ca, Mg dan S), dan mikro (Fe, Mn, B, Cu dan Mo), tetapi juga karbohidrat yang pada umumnya berupa gula untuk menggantikan karbon yang biasanya didapat dari hasil fotosintesis. Hasil yang lebih baik juga akan diperoleh, bila kedalam media tersebut ditambahkan vitamin-vitamin, asam amino dan zat pengatur tumbuh.

Zat pengatur tumbuh mempunyai peran yang sangat penting terhadap proses fisiologis dan efektif untuk memicu metabolisme sekunder secara *in vitro* pada tanaman.¹⁵ Zat pengatur tumbuh pada tanaman terdiri dari 5 kelompok yaitu auksin, sitokinin, giberelin, etilen dan inhibitor dengan ciri khas dan pengaruh yang berbeda terhadap proses fisiologis.²

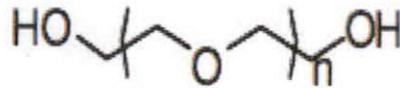
Dalam media kultur jaringan sitokinin berperan untuk pembelahan sel dan diferensiasi tunas adventif dari kalus atau organ.¹⁹ Sitokinin yang ditambahkan secara eksogen akan berpengaruh pada peningkatan sintesis protein, sintesis DNA, sintesis RNA, normalisasi aktivitas enzim, mempengaruhi aliran-aliran senyawa kimia, dan pengangkutan hara.² Beberapa senyawa yang termasuk kedalam golongan sitokinin adalah purin,

adenin dan 6-benzilaminopurin (BAP).¹⁹ Penggunaan BAP dengan konsentrasi tinggi dan masa yang panjang dapat menentukan kemampuan pembentukan jumlah daun dan bentuk tunas.¹⁵ Hal ini dipertegas oleh Purmaningsih (2003) bahwa sitokinin jenis BAP merupakan faktor kritis dalam induksi tunas. Penambahan BAP dalam media merangsang proliferasi tunas dalam kultur jaringan.

Keunggulan kultur jaringan adalah bisa dilakukannya manipulasi medium untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman dan tidak bergantung kepada kondisi lingkungan seperti keadaan geografis, iklim dan musim sehingga bisa dilakukan sepanjang tahun.¹⁷ Elisitasi merupakan proses penambahan elisitor pada sel tumbuhan dengan tujuan untuk menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder. Penambahan elisitor kedalam medium merupakan salah satu manipulasi medium yang dilakukan untuk meningkatkan metabolit sekunder tanaman. Elisitor terdiri atas dua kelompok, yaitu elisitor abiotik dan elisitor biotik. Elisitor abiotik dapat berasal dari senyawa anorganik, radiasi secara fisik seperti ultraviolet, logam berat dan deterjen.²⁰ Elisitor biotik dapat dikelompokkan dalam elisitor endogen dan elisitor eksogen. Elisitor endogen umumnya berasal dari bagian tumbuhan itu sendiri, seperti bagian dari dinding sel (oligogalakturonat) yang rusak oleh suatu serangan patogen melalui aktivitas enzim hidrolisis atau membran plasma yang mengalami kerusakan karena luka. Elisitor eksogen berasal dari dinding jamur misalnya kitin atau glukukan. Selain itu dapat berupa suatu senyawa yang disintesis oleh patogen misalnya protein.²¹

Secara *in vitro*, polietilen glikol, manitol dan sorbitol merupakan beberapa senyawa kimia yang bertindak menciptakan kondisi lingkungan dalam cekaman kekeringan.⁶ Polietilen glikol merupakan polimer netral yang tersedia dalam berbagai ukuran molekul, mudah larut dalam air dan dengan tingkat toksisitas yang rendah bagi tumbuhan. Karena hal tersebut, PEG sering digunakan dalam berbagai pengujian cekaman air pada tumbuhan. PEG memberikan efek menurunkan potensial air dari media tumbuh terutama media perakaran dan juga potensial air jaringan tumbuhan.¹³ Kekhasan PEG yang lainnya adalah dalam pengaturan tekanan osmotik mencakup rendahnya

tegangan permukaan dan meningkatnya viskositas atau kekentalan larutan.²² Penambahan PEG 6000 kedalam media *in vitro* diharapkan dapat meningkatkan metabolit sekunder tanaman , sebagai reaksi tanaman terhadap stress osmosis.



Gambar 4. Rumus bangun Polietilena Glikol.

Beberapa perubahan fisiologis yang dialami tumbuhan selama mengalami cekaman kekeringan antara lain adalah menurunnya kemampuan pertumbuhan sel seperti yang dilaporkan oleh Handa *et. al* (1982) pada sel tomat yang mengalami cekaman kekeringan. Veranjaneyulu dan Kumari (1989) memperoleh peningkatan prolina selama cekaman kekeringan pada tumbuhan *Morus* dimana akumulasi prolina terjadi pada akar dan daun. Halperin dan Flores (1997) mendapatkan peningkatan prolina bebas dalam akar tumbuhan *Hyosciamus muticus* yang mengalami cekaman air.

Cekaman kekeringan yang dialami oleh tumbuhan menyebabkan pertumbuhan yang tidak normal. Tirtoboma (1997) melakukan seleksi *in vitro* terhadap kalus tanaman kopi robusta yang toleran terhadap cekaman air dimana pada konsentrasi 0-5% eksplan mampu tumbuh dan membentuk organ yang lengkap, sedangkan pada konsentrasi 10% eksplan memperlihatkan pertumbuhan yang tidak normal dan tidak bertahan sewaktu diaklimatisasi sedangkan diatas 10% eksplan mengalami kematian.

III. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2009 sampai dengan bulan Juli 2010 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi dan Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Andalas, Padang.

3.2 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan metode Rancang Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 3 ulangan. Adapun perlakuan tersebut adalah konsentrasi PEG 6000, yaitu :

- A. 0 % PEG 6000
- B. 0,25% PEG 6000
- C. 0,5% PEG 6000
- D. 0,75% PEG 6000
- E. 1% PEG 6000

Dengan pengulangan sebanyak tiga kali setiap perlakuan. Jadi total unit perlakuan adalah $5 \times 3 = 15$

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Laminar Air Flow Cabinet (L AFC), autoclave, stoma, neraca analitik, hot plate, magnetic stirrer, erlenmeyer, botol kultur, gelas ukur, gelas piala, petridish, pipet tetes, gunting, pisau, pinset, scapel, lampu spiritus, kulkas, pH-meter, lampu UV, dan High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah eksplan *Theobroma cacao*, bahan-bahan kimia untuk pembuatan medium MS (Lampiran 1), PEG 6000, NaOH 0,5 N, HCl 0,5 N, alkohol 96% dan 70% (v/v), etil asetat p.a,

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi dilakukan pada semua alat yang digunakan. Botol kultur dicuci bersih dengan deterjen dan dibilas sampai bersih, kemudian direndam dalam larutan

'Bayclin' selama satu malam, dibilas sampai bersih dan keringkan di dalam oven, selanjutnya dibungkus dengan plastik kaca dan disterilisasi dengan autoklaf pada temperatur 121°C pada tekanan 15 psi selama 20 menit. Sterilisasi juga bisa dilakukan dengan menggunakan stoma, seperti untuk sterilisasi pinset, pisau kultur, kertas saring, gelas ukur, pipet takar, gelas piala, dan juga pada alat-alat gelas lainnya, pinset, pisau kultur dan kertas saring.

3.4.2 Pembuatan larutan stok medium MS

Semua zat penyusun medium MS ditimbang dan dilarutkan menurut kelompoknya. Stok hara makro (MS1), hara mikro (MS2), FE EDTA (MS3), dan vitamin (MS4) dilarutkan dalam 250 mL aquadest steril, stok myo-inositol (MS5) dilarutkan dalam 200 mL akuades steril. (Lampiran 1)

3.4.3 Pembuatan medium MS dengan variasi konsentrasi PEG

Medium dibuat sebanyak 100 mL dengan cara memasukkan masing-masing larutan stok yang telah dibuat dengan komposisi 5 mL stok MS1, 0,5 mL stok MS2, 0,5 mL stok MS3, 0,5 mL stok MS4, 1 mL MS5. Larutan diaduk sampai homogen. Selanjutnya ditambahkan 3 gram sukrosa, kemudian ditambahkan PEG 6000 dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Volume akhir dibuat menjadi 100 mL dengan menambahkan akuades. Setelah itu, pHnya diatur menjadi 5,8-6,0 dengan menggunakan pH-meter atau kertas pH. Jika pH-nya lebih tinggi, medium ditetesi dengan HCl 0,5 N sedangkan jika lebih rendah ditetesi dengan NaOH 0,5 N. Kemudian ditambahkan pematat media/ agar sebanyak 0,7 g. Setelah itu, media dimasak sampai mendidih. Selanjutnya media dimasukkan kedalam botol kultur dan ditutup dengan aluminium foil, dilapisi kertas lalu disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 20 menit.

3.4.4 Persiapan eksplan

Eksplan yang digunakan adalah embrio yang berasal dari biji *T. cacao* varietas hibrid yang telah masak, dimana kulit buah telah mengalami perubahan warna 50% atau lebih. Pulp yang melekat pada biji dibuang, kemudian biji dibersihkan dengan deterjen dan dibilas dengan akuades. Biji dipotong dibagian pangkal membentuk potong dadu, hingga tersisa sedikit daging buah yang melindungi embrio dari kontak langsung dengan larutan sterilisasi, selanjutnya eksplan

direndam dalam larutan 'Bayclin' 3 % selama 1 menit dan alkohol 70 % selama 30 detik. Eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali dan dikeringkan dengan tisu steril. Selanjutnya embrio dilepaskan dari daging buah dengan menggunakan pinset steril. Embrio ditanam pada medium padat MS. Biarkan selama 1 minggu untuk melihat kontaminasi. Setelah bebas dari jamur dan bakteri eksplan dikultur pada medium sesuai perlakuan. Bagan alir pelaksanaan penelitian disajikan pada lampiran 2.

3.4.5 Pengamatan

Pengamatan dilakukan setelah 6 minggu pengamatan terhadap parameter :

1. Bobot basah

Bobot basah ditimbang setelah 6 minggu masa kultur, dengan mengeluarkan eksplan dari botol kultur. Bagian akar eksplan dibersihkan hingga tidak ada medium yang menempel.

2. Kandungan katekin

Penentuan kandungan katekin dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan mengenai kandungan metabolit sekunder (katekin) dari eksplan *T. cacao* dengan pemberian beberapa konsentrasi PEG pada medium MS, maka didapatkan hasil sebagai berikut :

4.1 Bobot Basah Planlet *Theobroma cacao* yang Diberikan Beberapa Konsentrasi PEG 6000

Bobot basah planlet *T. cacao* yang diberi PEG pada masing-masing perlakuan setelah 6 minggu, didapatkan hasil seperti pada tabel 1.

Perlakuan	Bobot berat basah (gram)
A. 0% PEG	0,1855
B. 0,25% PEG	0,1808
C. 0,5 % PEG	0,2084
D. 0,75% PEG	0,1762
E. 1 % PEG	0,1577

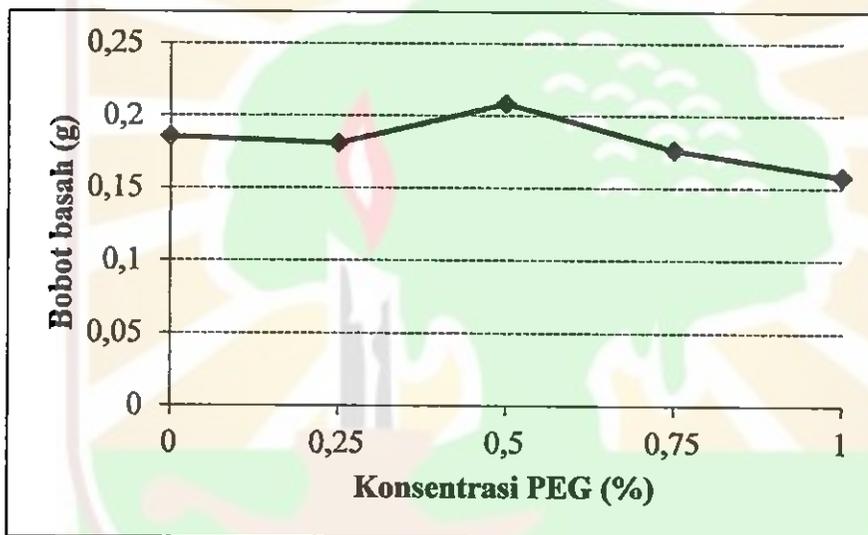
Tabel 1. Bobot basah planlet *T. cacao* dengan pemberian konsentrasi PEG pada medium MS 6 minggu setelah kultur.

Bobot basah yang didapatkan ini berhubungan dengan pertumbuhan batang dan akar, karena dengan penambahan PEG pertumbuhan batang dan akar akan terhambat sehingga bobot basah yang didapatkan juga berkurang. Semakin tinggi konsentrasi PEG yang ditambahkan kedalam medium maka bobot basah planlet *T. cacao* yang dihasilkan semakin turun, kecuali pada perlakuan C dengan penambahan 0,5% PEG (Grafik 1).

Bobot basah terendah didapatkan pada perlakuan E dengan penambahan 1% PEG kedalam medium yaitu 0,1577 gram. Hal ini disebabkan oleh kemampuan PEG mengikat air dengan ikatan hidrogen melalui aktivitas matriks sub unit etilen oksida. PEG memiliki peran dalam mensimulasikan cekaman kekeringan dan merupakan senyawa osmotikum yang larut dalam air dan dapat menyebabkan penurunan potensial air yang homogen. Besarnya penurunan air sangat tergantung pada konsentrasi dan berat molekul PEG. Sedangkan air adalah salah satu komponen fisik yang sangat vital dan dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Salah satu fungsi air adalah sebagai senyawa pelarut bagi

masuknya mineral-mineral dari larutan ke tanaman dan sebagai pelarut mineral nutrisi yang akan diangkut dari satu sel ke bagian sel. Sebanyak 85 – 90% dari bobot segar sel-sel dan jaringan tanaman adalah air²².

Penambahan PEG pada medium dengan konsentrasi tertentu menghambat penyerapan air dan garam mineral oleh sel-sel yang bersentuhan langsung dengan medium. Selain itu, PEG menyebabkan penghambatan mobilitas sukrosa yang terdapat pada medium sehingga mengganggu pemenuhan kebutuhan sukrosa yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan eksplan.²³



Grafik 1. Bobot basah planlet *T. cacao* dengan pemberian konsentrasi PEG pada medium MS 6 minggu setelah kultur.

Pada penelitian terhadap *Theobroma cacao* ini diperoleh bobot basah tertinggi pada perlakuan C dengan penambahan 0,5% PEG yaitu 0,2084gram. Hasil ini menunjukkan bahwa kondisi optimum untuk pertumbuhan eksplan *T. cacao* dalam medium MS dengan penambahan PEG didapat pada konsentrasi PEG 0,5%. Pada kondisi ini penyerapan air dan mobilitas sukrosa pada medium menjadi optimum sehingga eksplan dapat tumbuh dengan baik.

Pada medium dengan konsentrasi PEG kurang dari 0,5%, ketersediaan air dan sukrosa menjadi berlebih dan berpengaruh terhadap pertumbuhan eksplan. Sebaliknya, PEG dengan konsentrasi lebih dari 0,5% akan

menghambat penyerapan air dan mobilitas sukrosa. Hal ini menyebabkan nutrisi yang diberikan tidak dapat diserap oleh eksplan secara optimal sehingga pertumbuhan eksplan terhambat dan terlihat menguning. Respon tanaman yang mengalami cekaman kekeringan mencakup perubahan ditingkat seluler dan molekuler seperti perubahan pada pertumbuhan tanaman, volume sel menjadi lebih kecil, penurunan luas daun, daun menjadi tebal, adanya rambut pada daun, peningkatan ratio akar-tajuk, sensitivitas stomata, penurunan laju fotosintesis, perubahan metabolisme karbon dan nitrogen, perubahan produksi aktivitas enzim dan hormon, serta perubahan ekspresi.⁶

4.1 Kandungan Katekin Planlet *Theobroma cacao* yang Diberikan Beberapa Konsentrasi PEG 6000

Hasil penentuan kandungan katekin secara kuantitatif dari planlet *Theobroma cacao* dengan pemberian konsentrasi PEG yang berbeda pada medium MS 6 minggu setelah kultur menggunakan HPLC dapat dilihat pada tabel 2.

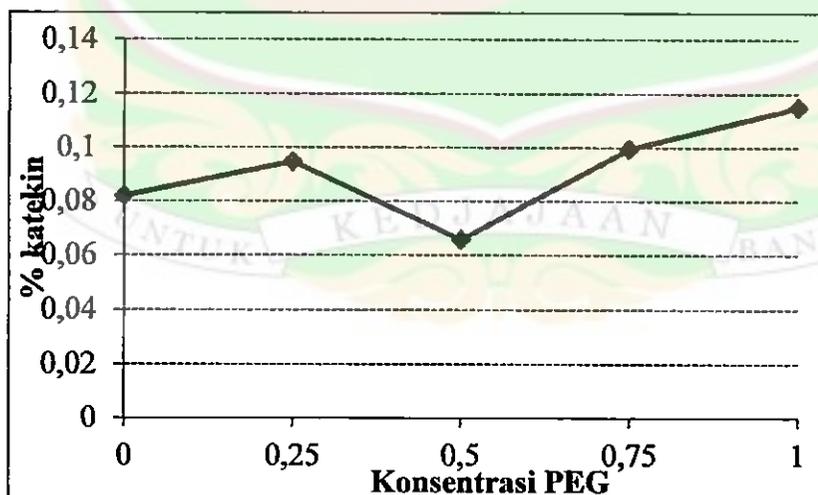
Perlakuan	Kandungan katekin (%)
A. 0% PEG	0,0819
B. 0,25% PEG	0,0948
C. 0,5 % PEG	0,0657
D. 0,75% PEG	0,0996
E. 1 % PEG	0,1151

Tabel 2. Hasil uji kandungan katekin *T. cacao* dengan pemberian konsentrasi PEG pada medium MS 6 minggu setelah kultur menggunakan HPLC.

Dari tabel 2 dapat dilihat bahwa kandungan katekin pada planlet *T. cacao* yang diberi perlakuan variasi PEG memberikan hasil yang berbeda-beda. Semakin tinggi konsentrasi PEG yang ditambahkan kedalam medium kandungan katekin yang dihasilkan semakin banyak, kecuali pada perlakuan C dengan penambahan 0,5% PEG. PEG merupakan senyawa osmolit yang menyebabkan tanaman mengalami stress osmosis. Dimana salah satu respon tanaman terhadap stress osmosis adalah dihasilkannya secara berlebihan jenis senyawa organik terlarut yang melindungi tanaman yaitu metabolit

sekunder. Senyawa ini termasuk prolin, sukrosa, polyols, glisin betain, alaninbetain, prolinbetain, kolin O-sulfat, hidroksiprolinbetain dan piperkolatbetain.²⁴

Dari hasil yang diperoleh (Tabel 2) dapat dilihat bahwa pemberian PEG pada medium dapat meningkatkan kandungan katekin yang dihasilkan. Kandungan katekin tertinggi didapatkan pada perlakuan E dengan penambahan 1% PEG yaitu sebesar 0,1151%. Kandungan katekin yang didapatkan pada penelitian ini belum mencapai hasil yang maksimal, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan konsentrasi PEG yang lebih besar. Pada penelitian Astuti (1999) dilaporkan bahwa penggunaan PEG dengan variasi konsentrasi (1,3,5 dan 7%) yang ditambahkan kedalam medium, dapat meningkatkan kandungan alkaloid dari tanaman *C.roseus*, sedangkan Sudarsono (2004) mendapatkan peningkatan kandungan senyawa prolin sebagai respon terhadap cekaman kekeringan dari enam kultivar kacang tanah, karena pada konsentrasi tertentu PEG berfungsi sebagai zat yang dapat menyebabkan stress osmosis sehingga terjadi akumulasi toksik ion pada sel-sel, sehingga sel-sel berusaha mempertahankan dirinya dengan menghasilkan suatu senyawa yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan sel.



Grafik 2. Hasil uji kandungan katekin *T. cacao* dengan pemberian konsentrasi PEG pada medium MS 6 minggu setelah kultur menggunakan HPLC.

Kandungan katekin terendah didapatkan pada perlakuan C dengan penambahan 0,5% PEG (Grafik 2), yaitu sebesar 0,0657%. Hal ini berkaitan dengan kondisi pertumbuhan eksplan *T. cacao* yang optimal pada penambahan 0,5% PEG sehingga tanaman tidak mengalami cekaman kekeringan dan menghasilkan katekin dengan jumlah yang sedikit.



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tentang kandungan metabolit sekunder katekin tanaman *Theobroma cacao* dengan pemberian beberapa konsentrasi PEG, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Peningkatan pertumbuhan eksplan *T. cacao* didapatkan pada penambahan 0,5% PEG dengan rata-rata bobot basah 0,2084gram. Rata-rata bobot basah terkecil pada penambahan 1% PEG, yaitu 0,1577 gram.
2. Penambahan PEG dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder katekin tanaman *T. cacao*. Kandungan katekin tertinggi didapatkan pada penambahan 1% PEG, yaitu sebesar 0,1151%.
3. Kandungan katekin terendah didapatkan pada penambahan 0,5% PEG yang merupakan kondisi optimum pertumbuhan tanaman *T. cacao* sebesar 0,0657%.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan studi lebih lanjut untuk peningkatan produksi metabolit sekunder katekin menggunakan PEG dengan konsentrasi yang lebih tinggi.
2. Studi peningkatan produksi metabolit sekunder katekin dengan menggunakan berbagai elisitor.

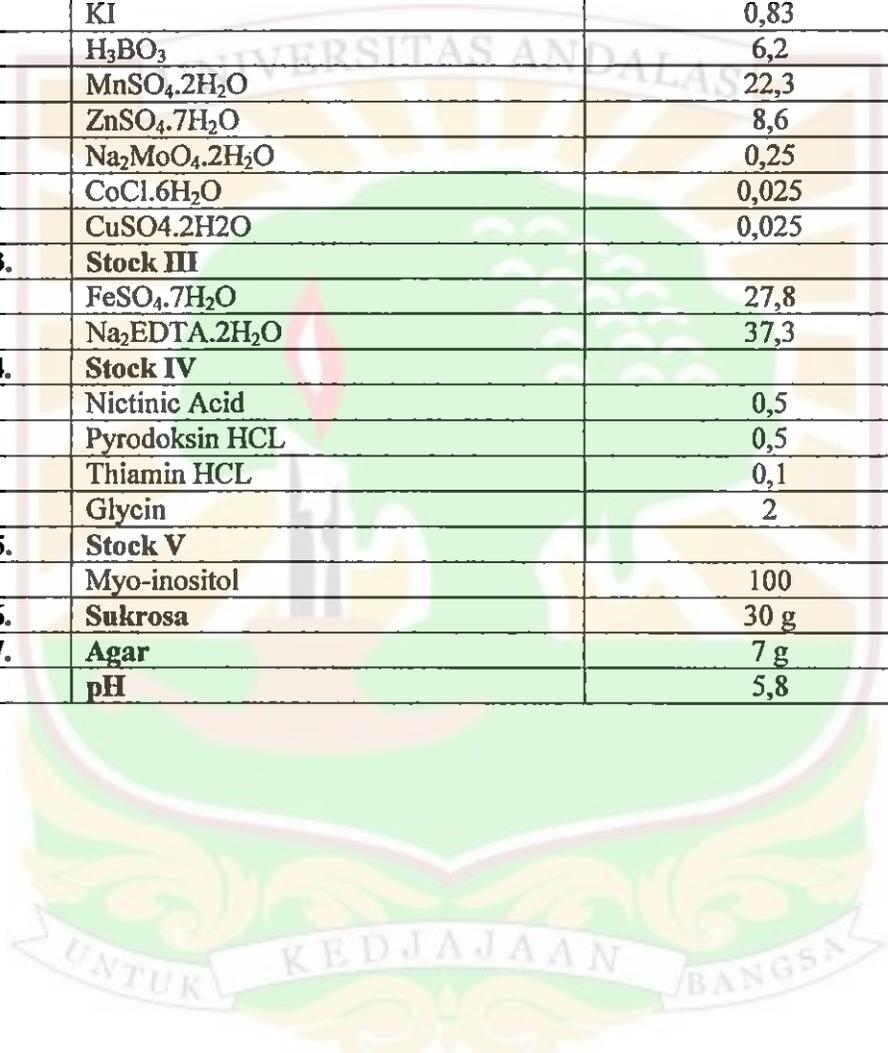
DAFTAR PUSTAKA

1. Othman, A. Ismail, A. Ghani, N. A. Adenan, I. 2007. *Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Cocoa Beans*. Food Chemistry. 100. 1523-1530
2. George, E.F dan P.D. Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Handbook and Directory of Commercial Ltd. Elsevier. England
3. Zhao, J., L.C. Davis, L. Verpoorte. 2005. *Elicitor Signal Transduction to Production of Plant Secondary Metabolites*. Biotechnology advances. 23: 283-333
4. Di Cosmo, F. and M. Misawa. 1995. *Plant Cell and Tissue Culture : Alternatives for metabolites production*. *Biotechnology Advances*. 3 : 425-453
5. Contin, A.R van der Heijden & R.Verpoorte. 1999. *Effects of Alkaloid Precursor Feeding and Elicitation on the Accumulation of Secologanin in a Catharanthus Roseus Dell Suspension Culture*. Plant Cell Tiss. & Org.Cult. 111-119
6. Rahayu, E.S., E.Guhardja, S.Ilyas, dan Sudarsono. 2005. *Polietilen Glikol (PEG) dalam Media In Vitro Menyebabkan Kondisi Cekaman yang Menghambat Tunas Kacang Tanah (Arachis hypogaea L.)*. Berk.Penel. Hayati 11: 39-48
7. Siregar, T.H.S. S, Riyadi. L, Nuraeni. 1988. *Cokelat*. Penebar Swadaya. Jakarta
8. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao. 2004. *Panduan Lengkap Budi Daya Kakao*. Agromedia Pustaka
9. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian. 1990. *Pembuatan Nata de Coco*. BBIHO. Bogor
10. Wattimena, G. A. 1991. *Bioteknologi Tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi (PAUB). Institut Pertanian Bogor. Bogor
11. Wetter, R.L dan F. Constabel. 1991. *Metode Kultur Jaringan Tanaman*. Diterjemahkan Mathilda B.W. dari *Plant Tissue Culture Methods*. Edisi II. Institut Teknologi Bandung (ITB). Bandung
12. Dachriyanus dan D. Arbain. 1997. *Isolasi Alkaloida dari Tumbuhan Ophiorrhiza bracteata Korth.*, Pusat Penelitian Universitas Andalas. Padang
13. Haq, N. 2003. *Production of Bioactive Compound*. In Vitro Production of Bioactive Compound from Medical and Aromatic Plant. ICUC. University of Southampton. U.K. 1-22

14. Markham, K. R. 1988. *Cara Identifikasi Flavonoid*. ITB. Bandung
15. Gunawan, L. W., N. A. Mattjik., E. Sjamsudin., A. Wiendi dan A. Ernawati. 1991. *Bioteknologi Tanaman*. Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. Pusat Antar Universitas Bioteknologi (PAUB). Institut Pertanian Bogor (IPB). Bogor
16. Subroto, M.A dan N. Artanti. 1996. *Aplikasi Teknologi Akar Rambut untuk Pemanfaatan dan Pemuliaan Tumbuhan Obat Indonesia Prospek dan Permasalahannya*. Prosiding Simposium Nasional I Tumbuhan Obat dan Aromatik. APINMAP. Jakarta. 261-267
17. Fowler, M.W. 1983. *Commercial Application and Economics Aspect of Plant Mass Cell Culture*. (Eds : Mantel, S.H dan Smith). Plant Biotechnology. Cambridge. University Press. Cambridge
18. Rahardja, P.C. 1990. *Kultur Jaringan Teknik Perbanyakan Tanaman Secara Modern*. Penerbit Swadaya:Jakarta
19. Widyatusti, N., dan D. Tjokrokusumo. 2001. *Peranan Beberapa Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) Tanaman Pada Kultur In Vitro*. Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia 3(5): 55-63
20. Logemann, E., Wu, S., Schroder, J., Schmelzer, E., Sommissich, I.E., Hahlbrock, K., 1995. *Gene Activation by UV Light, Fungal Elicitor or Fungal Infection in Petroselinum Crispum in Correlated with Repression of Cell Cycle-Related Genes*. *The plant Journal*, 8(6): 865-876
21. Esyanti, R.R.1995. *Biologi Molekul pada Sistem Pertahanan Tumbuhan terhadap Penyakit*. Seminar Biologi Molekul. Jurusan Biologi. Institut Teknologi Bandung
22. Lawlor, D.W. 1970. *Absorption of Poliethilene Glicol by Plants Enther Effect on Planth Growth*. *New Physiol*. 69: 501-513
23. El- Rahman, A., M. F. Al-Ansary, A. A. Rizkalla and A. M. Badt-Elden. 2007. *Micropropagation and Biochemical Genetic Markers Detection for Drought and Salt Tolerance of Pear Rootstock*. *Australian journal of Basic and Applied Sciences* 1(4) : 625-636
24. Edward, R dan J.A. Gatehouse. 1999. *Secondary Metabolism in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Second Edition. (Eds : Lea P.J dan R.C. Leegood). John Willey and Son. England. 193-218
25. Tri Astuti. 1999. *Induksi metabolit sekunder Alkaloid pada kultur In Vitro Catharantus Roseu.*, Skripsi Sarjana Kimia. Jurusan Kimia. Unand. Padang.

Lampiran 1. Komposisi Medium Murashige & Skoog (MS)

No.	Komponen	MS (mg/L)
1.	Stock I	
	NH ₄ NO ₃	1650
	KNO ₃	1900
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
2.	Stock II	
	KI	0,83
	H ₃ BO ₃	6,2
	MnSO ₄ .2H ₂ O	22,3
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
	CoCl.6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .2H ₂ O	0,025
3.	Stock III	
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
4.	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
	Stock IV	
	Nictinic Acid	0,5
	Pyrodoksin HCL	0,5
	Thiamin HCL	0,1
	Glycin	2
5.	Stock V	
	Myo-inositol	100
6.	Sukrosa	30 g
7.	Agar	7 g
	pH	5,8

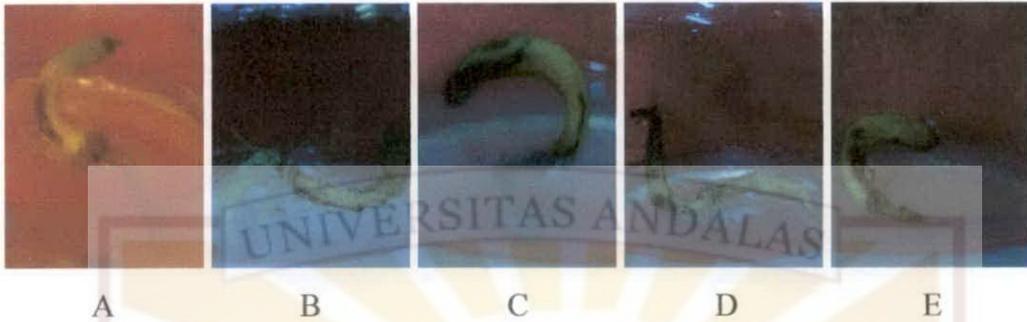


Lampiran 2. Proses Penanaman Eksplan Embrio *T. cacao* Pada Pedium MS

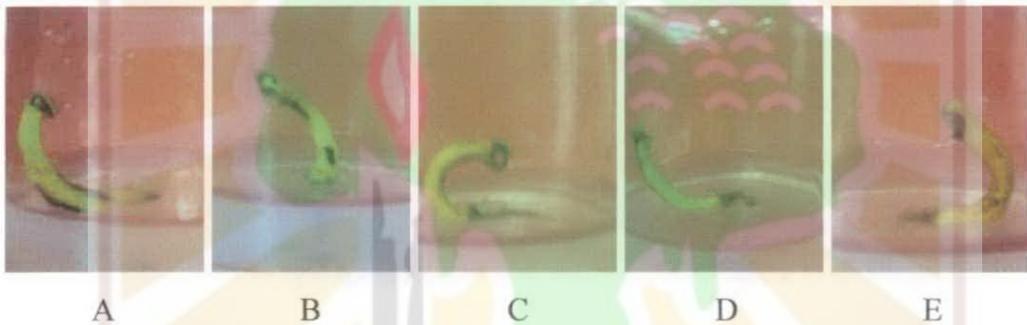


Lampiran 3. Gambar Planlet *T.cacao* dengan Pemberian Konsentrasi PEG pada Medium MS 6 Minggu Setelah Tanam

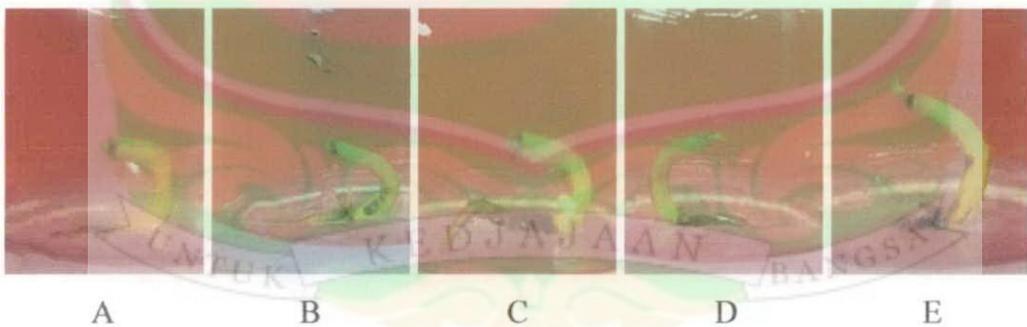
Ulangan 1



Ulangan 2



Ulangan 3



Keterangan :

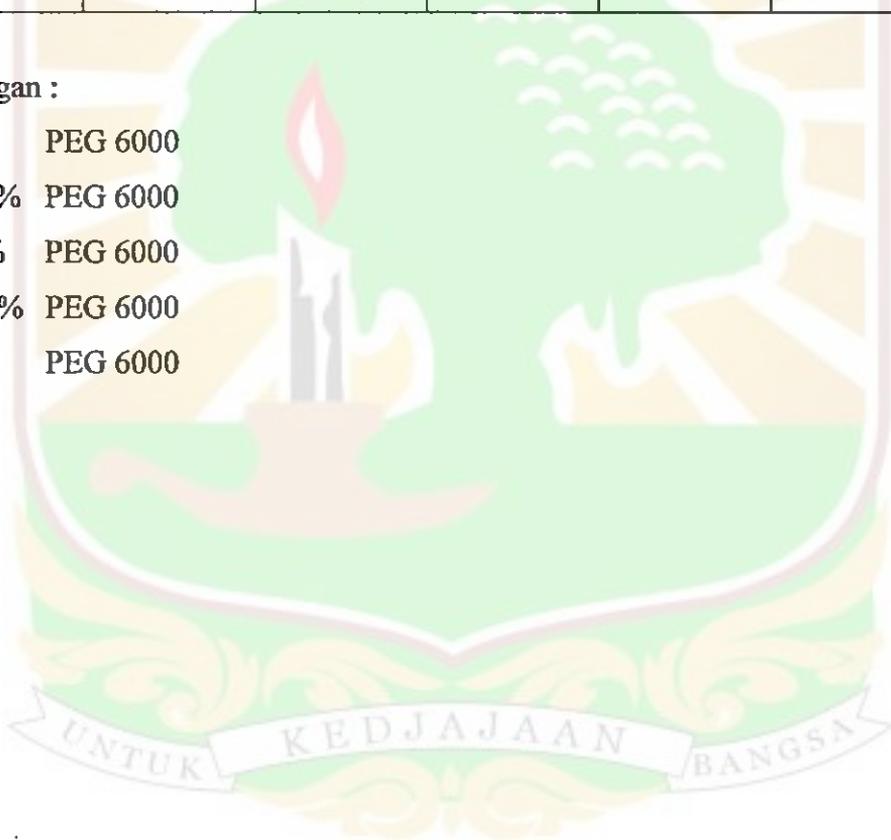
- A. 0% PEG 6000
- B. 0,25% PEG 6000
- C. 0,5% PEG 6000
- D. 0,75% PEG 6000
- E. 1% PEG 6000

Lampiran 4. Tabel Rata-rata Bobot Basah Planlet Tanaman *T. cacao* dengan Pemberian Konsentrasi PEG 6 Minggu Setelah Kultur

Ulangan	Bobot Basah (g)				
	Perlakuan				
	A	B	C	D	E
1	0,2050	0,2034	0,2178	0,2011	0,1743
2	0,1925	0,1800	0,2163	0,1713	0,1625
3	0,1590	0,1589	0,1911	0,1563	0,1363
Total	0,5565	0,5423	0,6252	0,5287	0,4731
Rata-rata	0,1855	0,1808	0,2084	0,1762	0,1577

Keterangan :

- A. 0% PEG 6000
- B. 0,25% PEG 6000
- C. 0,5% PEG 6000
- D. 0,75% PEG 6000
- E. 1% PEG 6000



Lampiran 5. Tabel Rata-rata Kandungan Katekin Planlet *Theobroma cacao* dengan Pemberian Konsentrasi PEG 6 Minggu Setelah Tanam Menggunakan HPLC

Ulangan	Kandungan Katekin (%)				
	Perlakuan				
	A	B	C	D	E
1	0,0643	0,0767	0,0507	0,0847	0,1020
2	0,0906	0,1086	0,0665	0,0873	0,1141
3	0,0907	0,0991	0,0799	0,1267	0,1293
Total	0,2456	0,2844	0,1971	0,2987	0,3454
Rata-rata	0,0819	0,0948	0,0657	0,0996	0,1151

Keterangan :

- A. 0% PEG 6000
- B. 0,25% PEG 6000
- C. 0,5% PEG 6000
- D. 0,75% PEG 6000
- E. 1% PEG 6000