

INDUKSI TANAMAN CENDANA (*Santalum album* L.) TRIPLOID MELALUI KULTUR ENDOSPERMA SECARA *IN VITRO*

INDUCTION OF TRIPLOID SANDALWOOD PLANT (*Santalum album* L.) THROUGH ENDOSPERM CULTURE *IN VITRO*

Lazarus Agus Sukamto

Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Jln. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong 16911

e-mail: lazarus_agus@yahoo.com

ABSTRACT

Sandalwood (Santalum album L.) is an over exploitation that causes the population decreases drastically. An experiment was carried out to get triploid plant by using young seed culture. Young seeds of sandalwood were peeled and grew on solid Murashige and Skoog (MS) media formulation with or without addition hormones of α -naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-benzylaminopurine (BA) or kinetin (K). The young seed did not form shoot, but its endosperm formed callus. The endosperm produced callus 26.67% on media with addition of BA 1 mg/l, but not on media without any addition of hormone. The best callus production was on media with addition of NAA 2 mg/l and BA 1 mg/l. The best somatic embryos formation was NAA 1 mg/l + BA 1 mg/l and shoot formation was 2,4-D 1 mg/l + K 1 mg/l treatments. The resulted shoots from endosperms are expected to be triploid plants.

Keywords: Endosperm, In vitro cultured, Triploidy, Sandalwood, *Santalum album*

ABSTRAK

Tanaman cendana (Santalum album L.) mengalami penebangan yang berlebihan yang menyebabkan populasinya mengalami penurunan secara drastis. Penelitian dilakukan untuk mendapatkan tanaman triploid dengan menggunakan kultur biji yang masih muda. Biji yang masih muda dikupas dan ditumbuhkan pada media padat formulasi Murashige and Skoog (MS) dengan atau tanpa tambahan zat pengatur tumbuh α -naphthaleneacetic acid (NAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-benzylaminopurine (BA) atau kinetin (K). Biji muda tidak membentuk tunas, tetapi endospermanya membentuk kalus. Endosperma memproduksi kalus 26,67% pada media dengan tambahan BA 1 mg/l, tetapi tidak memproduksi kalus pada media tanpa tambahan zat pengatur tumbuh. Produksi kalus terbaik pada media dengan tambahan NAA 2 mg/l dan BA 1 mg/l. Pembentukan embrio somatik terbaik pada perlakuan media NAA 1 mg/l + BA 1 mg/l dan pembentukan tunas terbaik pada perlakuan media 2,4-D 1 mg/l + K 1 mg/l. Tunas tanaman yang tumbuh dari endosperma dipercaya adalah tanaman triploid.

Kata kunci: kultur endosperma, in vitro, tanaman triploid, cendana, *Santalum album*

PENDAHULUAN

Cendana (*Santalum album* L.) merupakan tanaman semi parasit yang sebagian dari fase hidupnya memerlukan tanaman inang. Tanaman inangnya dapat berupa tumbuhan kecil sampai tumbuhan besar berkayu. Tanaman cendana bernilai ekonomi yang tinggi karena dapat digunakan sebagai bahan baku farmasi, kosmetik, sabun, kerajinan ukiran kayu, dupa, obat-obatan, seremoni, dan

sebagainya.^{1,2} Bagian tanaman yang dipanen yaitu akar dan batangnya banyak mengandung minyak atsiri dengan aroma yang spesifik. Kandungan minyaknya dapat mencapai 10% dari berat akar dan 1,50%–2,10% dari berat kayunya atau rata-ratanya berkisar 4,50%–6,25%.³

Hasil panen cendana memberikan sumbangan yang sangat besar terhadap pendapatan asli daerah (PAD) NTT, yaitu berkisar 28,20%–

47,60% dari tahun 1986/1987–1990/1991.⁴ Eksploitasi dan pencurian pohon cendana yang tidak terkendali menyebabkan penurunan populasi tanaman cendana yang drastis hingga NTT kehilangan PAD-nya. Penggalakan dan dibukanya hutan tanaman industri (HTI) di NTT yang salah satu tanaman prioritasnya adalah cendana memerlukan benih atau bibit cendana dalam jumlah yang sangat besar. Perbanyak cendana secara tradisional yaitu secara generatif dengan bibit yang berasal dari biji yang mengalami banyak kendala, di antaranya biji cepat mengalami penurunan daya kecambah, persentase perkecambahan yang rendah, satu biji hanya menghasilkan satu tanaman, pertumbuhan lambat dan umur panen yang lama, yaitu lebih dari 20 tahun.

Endosperma adalah jaringan triploid yang terdapat pada biji, hasil dari penyatuan dua inti polar gamet betina dengan satu inti gamet jantan yang berbeda dengan embrio dalam jumlah kromosomnya. Fungsi endosperma adalah memelihara embrio selama pertumbuhan pada fase heterofit dan memberikan sumber energi selama perkecambahan dan pertumbuhan embrio.⁵ Tanaman triploid ($2n = 3x$) adalah tanaman yang jumlah kromosomnya kelipatan tiga dari kromosom dasarnya ($3n$), buahnya kebanyakan tidak berbiji atau berbiji tapi steril. Tanaman triploid tidak diinginkan bila bertujuan untuk menghasilkan benih/biji yang komersial karena tidak terjadi pembentukan biji, tetapi sangat berharga karena memberikan nilai tambah ekonomi yang tinggi. Tanaman triploid memberikan keuntungan nilai tambah ekonomi yang tinggi, yaitu pertumbuhan tanamannya lebih cepat, selain menghasilkan bunga yang lebih besar, seperti pada *Petunia axillaris*,⁶ buah yang kebanyakan tidak berbiji atau berbiji tetapi steril, seperti pada buah pisang, apel, jeruk, anggur, pepaya,^{7,8} dapat dipanen lebih awal dan mendapatkan biomassa kayu yang lebih besar, seperti pada *Populus tremuloides* untuk bahan baku kertas.^{9,8}

Tanaman triploid dapat dihasilkan dari persilangan antara tanaman normal diploid ($2n = 2x$) dengan tanaman tetraploid ($2n = 4x$), seperti pada tanaman jeruk^{10,11} dan pepaya.¹² Protokol untuk mendapatkan tanaman triploid melalui persilangan menghadapi banyak kendala,

yaitu memerlukan penahanan/waktu yang panjang untuk mendapatkan tanaman tetraploid, dengan menggandakan jumlah kromosom dan menunggu tanaman tetraploid berbunga untuk dapat disilangkan dengan tanaman diploid. Tanaman tetraploid tingkat sterilitasnya tinggi,⁶ daya kecambah biji hasil persilangan sangat rendah karena kegagalan perkembangan endosperma, diikuti dengan keguguran embrio yang berkorelasi dengan perbandingan jumlah kromosom endosperma dengan embrio yang tidak tepat 3:2 seperti pada biji yang normal.^{13,14} Perbanyak tanaman secara vegetatif melalui kultur endosperma secara *in vitro* merupakan pilihan yang terbaik karena dapat menghasilkan tanaman triploid dalam jumlah besar dan waktu yang relatif pendek.

Biji tanaman cendana termasuk biji yang endosperma, yaitu endosperma masih utuh ketika biji mengalami kemasakan, berbeda dengan biji yang non-endosperma, yaitu endosperma habis diserap oleh embrio ketika biji masak. Perbanyak cendana secara *in vitro* telah dilakukan dengan menggunakan berbagai eksplan, seperti hipokotil dan stem,¹⁵ embrio,^{16,17} ruas,¹⁸ daun,¹⁹ dan endosperma.^{20,15,21} yang telah berhasil untuk tingkatan tertentu dan masih memerlukan penelitian lebih lanjut. Percobaan kultur jaringan dilakukan dengan menggunakan eksplan biji muda cendana yang endospermanya masih meristematis hingga dimungkinkan mengalami morfogenetis membentuk kalus, somatik embrio, dan tunas pada media kultur yang tepat. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan tanaman cendana triploid melalui kultur endosperma secara *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Percobaan dilakukan di laboratorium Treub, Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Bogor. Bahan percobaan berasal dari daerah Soe dan Kupang, NTT yaitu berupa buah-buah muda cendana yang masih berwarna hijau. Bahan tersebut setelah dipetik dari pohon segera dimasukkan dalam kantong plastik dan ditaruh dalam termos es yang diberi es sebagai pendingin, disimpan dalam almari es sesampai di Kota Kupang dan Bogor.

Buah-buah cendana muda didesinfestasi dengan alkohol 95% beberapa detik dan dibakar sekilas dengan api spiritus, dikupas kulit luar

dan tempurung bijinya, dan didesinfestasi dengan kloroks, kemudian dibilas dengan air suling steril beberapa kali dalam *laminar air flow* di Laboratorium Kultur Jaringan, Puslitbang Biologi-LIPI, Cibinong. Biji-biji tersebut ditanam pada media padat formulasi Murashige and Skoog,²² dengan komposisi sebagai berikut: KNO₃ 1.900 mg/l, NH₄NO₃ 1.650 mg/l, CaCl₂.2H₂O 440 mg/l, MgSO₄.7H₂O 370 mg/l, KH₂PO₄ 170 mg/l, FeNaEDTA 37,25 mg/l, nicotinic acid 0,5 mg/l, vitamin B₆ 0,5 mg/l, vitamin B₁ 0,1 mg/l, FeSO₄.7H₂O 13,9 mg/l, MnSO₄.4H₂O 11,15 mg/l, ZnSO₄.7H₂O 4,3 mg/l, H₃BO₃ 3,1 mg/l, KI 0,415 mg/l, NaMoO₄.2H₂O 0,125 mg/l, CoCl₂.6H₂O 0,0125 mg/l, CuSO₄.5H₂O 0,0125 mg/l, Glycine 2 mg/l, myo-inositol 100 mg/l, sukrosa 30 g/l, gelrite 2 g/l, tanpa atau dengan tambahan zat pengatur tumbuh (ZPT).

ZPT yang digunakan yaitu auksin dan sitokinin. Jenis auksinnya adalah NAA atau 2,4-D yang berkonsentrasi 1 atau 2 mg/l, sedangkan jenis sitokininnya adalah BA berkonsentrasi 1 mg/l atau 2 mg/l atau K berkonsentrasi 1, 2 atau 3 mg/l dan pH diatur 5,7 sebelum diautoklaf. Media diisikan pada tiap botol sebanyak 10 ml dengan menggunakan alat dispenser. Media diautoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 psi selama 25 menit. Kultur diinkubasi dalam ruang terkondisi suhunya sekitar 25°C dengan pencahayaan alami matahari secara tidak langsung. Pengamatan dilakukan setelah 9,5 bulan tanam di laboratorium kultur jaringan. Parameter yang diamati yaitu kontaminasi eksplan, pembentukan kalus, embrio somatik, tunas, dan akar. Hasilnya berupa persentase pembentukan masing-masing parameter yang diamati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat kontaminasi eksplan buah muda

Dari percobaan pendahuluan (tidak dipublikasi), kultur biji-biji muda cendana asal daerah Kupang dan Soe, NTT mengalami banyak kontaminasi jamur dan bakteri karena penanganan sesudah petik dan transpor yang kurang baik. Dalam penelitian ini, kontaminasi eksplan yang terjadi dapat dikurangi, yaitu dari 95% menjadi 5%. Hal ini terjadi karena buah-buah muda masih segar ketika inisiasi percobaan dilakukan di Bogor, dengan perbaikan dalam penanganan buah sesudah

panen pada suhu yang relatif rendah ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) dan transportasi dengan wadah yang lebih memadai.

Pembentukan kalus

Embrio dari biji cendana yang masih muda dalam media kultur mengalami hambatan untuk berkecambah dan tetap dorman di dalam endosperma. Endosperma cendana tidak membentuk kalus pada media tanpa penambahan ZPT (kontrol), tetapi membentuk kalus pada media dasar MS dengan penambahan ZPT. Pembentukan kalus terjadi pada permukaan endospermnya. Penambahan ZPT BA sebesar 1 mg/l pada media kultur menyebabkan 26,67% eksplan buah muda cendana membentuk kalus. Eksplan membentuk kalus terbanyak pada kombinasi perlakuan NAA 2 mg/l dan BA 1 mg/l (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa biji muda cendana tidak mempunyai ZPT endogen yang cukup untuk pembentukan kalus, hingga untuk terjadinya kalus perlu penambahan ZPT dari luar. Hasil yang serupa juga diperoleh oleh Lakshmi Sita *et al.*²¹ dari kultur endosperma cendana, tetapi hasil yang berbeda didapat oleh Rao and Ram,¹⁵ yaitu kalus terbanyak didapat dari perlakuan 2,4-D 1 mg/l atau kombinasinya dengan K 0,2 mg/l. Ini mungkin disebabkan adanya perbedaan jenis eksplan, konsentrasi ZPT, dan genotipe cendana yang digunakan.

Perlakuan kombinasi ZPT 2,4-D dan K kurang efisien dibanding kombinasi NAA dan BA atau BA tunggal dalam merangsang terbentuknya kalus pada biji muda cendana. Hal ini menunjukkan bahwa sitokinin K yang dikombinasikan dengan 2,4-D tidak seefisien BA yang dikombinasikan dengan NAA dalam merangsang terbentuknya kalus. Hasil penelitian lain juga menunjukkan sitokinin BA lebih efektif dalam merangsang pembentukan kalus dibanding K pada kultur tanaman lengkeng.²³

Pembentukan embrio somatik

Pembentukan embrio somatik (*somatic embryogenesis*) terjadi pada kalus yang ditumbuhkan pada media dengan tambahan kombinasi ZPT NAA 1 mg/l + BA 1 mg/l, 2,4-D 1 mg/l + K 1 mg/l dan 2,4-D 2 mg/l + K 3 mg/l, tetapi kombinasi ZPT yang paling efektif dalam membentuk embrio

Tabel 1. Persentase Terbentuknya Kalus, Embrio Somatik, Tunas, dan Akar dari Eksplan Biji Muda Cendana

Perlakuan ZPT	Kalus (%)	Embrio somatik (%)	Tunas (%)	Akar (%)
Kontrol	0	0	0	0
BA1	26,67	0	0	0
NAA1 + BA1	30,77	7,69	0	0
NAA1 + BA2	17,65	0	0	0
NAA2 + BA1	50,00	0	0	0
2,4-D1 + K1	23,81	4,76	4,76	0
2,4-D1 + K2	11,76	0	0	0
2,4-D2 + K1	11,54	0	0	0
2,4-D2 + K3	18,52	3,70	0	0

Keterangan

ZPT : zat pengatur tumbuh

BA1 : 6-Benzylaminopurine

NAA : α -Naphthaleneacetic acid

D : 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

K : Kinetin

1, 2, 3: konsentrasi 1, 2, 3 mg/l

somatik adalah NAA 1 mg/l dan BA 1 mg/l (Tabel 1). Namun, Rangaswamy dan Rao²⁰ mengalami kegagalan dalam menginduksi pembentukan embrio somatik dari kalus cendana yang berasal dari eksplan biji tua. Keberhasilan yang serupa dengan ZPT yang berbeda dilaporkan oleh Lakshmi Sita *et al.*²¹ yang menggunakan kombinasi BA 0,3 mg/l + K 0,3 mg/l + indole acetic acid (IAA) 1 mg/l dan gibberelic acid (GA) 1 mg/l, juga Rao and Ram¹⁵ pada kombinasi IAA 1 mg/l + BA 1 mg/l pada kultur endosperma cendana, sedangkan Mariska dan Sukmadjaja¹⁷ memperoleh embrio somatik yang paling efisien pada perlakuan BA 1 mg/l dari eksplan embrio zigotik masak dan BA 2 mg/l dari eksplan embrio zigotik muda. Hal ini mungkin disebabkan perbedaan genotipe, ZPT, dan konsentrasi ZPT-nya.

Pembentukan tunas dan akar

Pertumbuhan embrio somatik menjadi tunas hanya terjadi pada perlakuan kombinasi 2,4 D 1 mg/l dan K 1 mg/l, tetapi tidak terjadi pada perlakuan NAA 1 mg/l + BA 1 mg/l ataupun 2,4-D 2 mg/l + K 3 mg/l (Tabel 1). Tunas tumbuh menjadi planlet (tanaman muda) dan membentuk percabangan tanpa pembentukan akar. Kegagalan yang sama dilaporkan oleh Rangaswamy dan Rao²⁰ dalam menginduksi tunas dari kalus pada kultur biji cendana tua, juga Johri and Bhojwani²⁴ pada kultur biji tua *Exocarpos*

cupressiformis yang masih satu famili dengan cendana. Keberhasilan yang sama diperoleh oleh Lakshmi Sita *et al.*²¹ dalam menumbuhkan embrio somatik menjadi tunas pada perlakuan IAA 0,5 mg/l, sedangkan Rao and Ram¹⁵ berhasil pada kombinasi IAA 1 mg/l + IBA 0,5 mg/l + GA₃ 0,5 mg/l pada kultur endosperma cendana. Lakshmi Sita *et al.*²¹ melaporkan tanaman cendana yang tumbuh dari kultur endosperma terbukti adalah triploid ($3n = 30$). Semua plantlet hasil kultur tidak ada yang membentuk akar. Hal ini menunjukkan cendana merupakan tanaman yang sukar berakar. Hasil yang sama terjadi pada tanaman berkayu lainnya.^{17,18,25,26,27}

KESIMPULAN

Endosperma cendana membentuk kalus pada media yang diberikan tambahan ZPT. Produksi kalus terbaik pada media yang diberi tambahan NAA 2 mg/l and BA 1 mg/l. Perlakuan terbaik untuk menginduksi pembentukan embrio somatik yaitu pada media kultur yang diberi tambahan NAA 1 mg/l + BA 1 mg/l. Embrio somatik tumbuh menjadi tanaman pada media kultur yang diberi tambahan 2,4-D 1 mg/l + K 1 mg/l. Tanaman hasil kultur endosperma tidak membentuk perakaran. Tanaman yang tumbuh dari jaringan endosperma cendana dapat diharapkan adalah tanaman cendana yang triploid.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Brand, J. and P. Jones. 1999. *Growing Sandalwood (Santalum spicatum) on Farmland in Western Australia*. Australia: Sandalwood Information Sheet, Department of Conservation and Land Management.
- ²Rahayu, S., A.H. Wawo, M. van Noordwijk, dan K. Hairiah. 2002. *Cendana, Deregulasi dan Strategi Pengembangannya*. World Agroforestry Centre-ICRAF.
- ³Harisetijono and S. Suriamihardja. 1991. Sandalwood: Specially Emphasized on Sandalwood of the Province of East Nusa Tenggara. *Savana* 6: 1–6.
- ⁴Anonim. 1992. *Perkembangan Penelitian dan Pengembangan Cendana di Nusa Tenggara*. Laporan Penelitian, Balai Penelitian Kehutanan. Kupang: Kementrian Kehutanan.
- ⁵Johri, B.M. and S.S. Bhojwani. 1977. Triploid Plants through Endosperm Culture. In J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (Eds.). *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*: 398–411. Berlin: Springer-Verlag.
- ⁶Gupta, P.P. 1982. Genesis of Microspore-derived Triploid Petunias. *Theoretical Applied Genetics*, 61: 327–331.
- ⁷Sanford, J.C. 1983. Ploidy Manipulations. In J.N. Moore and J. Janick (Eds.). *Methods in Fruit Breeding*: 100–123. Indiana: Purdue University Press.
- ⁸Thomas T.D. and Chaturvedi R. 2008. Endosperm Culture: a Novel Method for Triploid Plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93(1):1–14.
- ⁹Johri, B.M., P.S. Srivastava, and A.P. Raste. 1980. Endosperm Culture. In I.K. Vasil (Ed.). *International Review of Cytology, Supplement 11B, Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*: 157–182. New York: Academic Press.
- ¹⁰Soost, R.K. and J.W. Cameron. 1980. ‘Oroblanco’, a Triploid Pummelo-grapefruit Hybrid. *Hort-Science*, 15 (5): 667–669.
- ¹¹Oiyama, I. and S. Kobayashi. 1990. Polyembryony in Underdeveloped Monoembryonic Diploid Seeds Crossed with a *Citrus* Tetraploid. *HortScience*, 25 (10): 1276–1277.
- ¹²De Zarpa, D.M. 1957. Triploides de *Carica papaya*. *Agronomia Tropical*, VII(2): 83–86.
- ¹³Lakshmi Sita, G. 1987. Triploids. In J.M. Bonga and D.J. Durzan (Eds.). *Cell and Tissue Culture in Forestry Vol. 2*: 269–284. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- ¹⁴Soost, R.K. 1987. Breeding *Citrus*-genetics and Nucellar Embryony. In A.J. Abbott and R.K. Atkin (Eds.). *Improving Vegetatively Propagated Crops*: 83–110. London: Academic Press.
- ¹⁵Rao, P.S. and N.V.R. Ram. 1983. Propagation of Sandalwood (*Santalum album* Linn) Using Tissue and Organ Culture Technique. In S.K. Sen and K. L. Giles (Eds.). *Plant Cell Culture in Crop Improvement*: 119–124. New York and London: Plenum Press.
- ¹⁶Rai, V.R. and J. McComb. 2002. Direct Somatic Embryogenesis from Mature Embryos of Sandalwood. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 65–70.
- ¹⁷Mariska I. dan Sukmadjaja. 2003. *Mikropropagasi Tanaman Cendana melalui Embrio Somatik*. Laporan Penelitian DIP TA 2003, Balai Penelitian Sumber Daya Genetik dan Konservasi. Bogor: Kementerian Pertanian.
- ¹⁸Sukanto L.A. 2003. Perbanyak Mikro Tanaman Cendana Dewasa. *Gakuryoku*, IX (2):197–200.
- ¹⁹Mujib, A. 2005. *In Vitro* Regeneration of Sandal (*Santalum album* L.) from Leaves. *Turkey Journal Botany*, 29: 63–67.
- ²⁰Rangaswamy, N.S. and P.S. Rao. 1963. Experimental Studies on *Santalum album* L.- Establishment of Tissue Culture of Endosperm. *Phytomorphology*, 13(4): 450–454.
- ²¹Lakshmi Sita, G., N.V.R. Ram, and C.S. Vaidyanathan. 1980. Triploid Plants from Endosperm Cultures of Sandalwood by Experimental Embryogenesis. *Plant Science Letters*, 20: 63–69.
- ²²Murashige, T. and F. Skoog. 1962. Medium for Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- ²³Litz, R.E. 1988. Somatic Embryogenesis from Cultured Leaf Explants of the Tropical Tree *Euphoria longan* Stend. *Jurnal Plant Physiology*, 132: 190–193.
- ²⁴Johri, B.M. and S.S. Bhojwani. 1965. Growth Responses of Mature Endosperm in Cultures. *Nature*, 208 (5017): 1345–1347.
- ²⁵Nemeth, G. 1986. Induction of Rooting. In Y.P. S. Bajaj (Ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 1, Trees I: 49–64. Berlin: Springer-Verlag.
- ²⁶Wardana S.T., Purbaningsih S., dan Rimbawanto A. 1999. Induksi Tunas dan Akar Tanaman Cendana (*Santalum album* L.) secara *In Vitro*. *Prosiding Seminar Nasional Konservasi Flora Nusantara*: 275–278. Bogor: UPT Balai Pengembangan Kebun Raya-LIPI.
- ²⁷Sukanto, L.A. 2002. Upaya Perbanyak Cendana (*Santalum album* L.) dengan Cara Cangkok. *Prosiding Simposium Nasional II Tumbuhan Obat dan Aromatik*: 381–385. Bogor: Pusat Penelitian Biologi-LIPI.

