

**Identifikasi Kalus Embriogenik pada
Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) Klon Sulawesi 01**
***Identification of Embryogenic Callus in
Cocoa Plants (*Theobroma cacao* L.) of Sulawesi Clone 01***

Rijal Daivu Duri*), Hilda Mutiara Salsabila, Rahmanda Mumtaz, Rahmawati

Program Studi Budidaya Tanaman Perkebunan, Jurusan Produksi Pertanian,
Politeknik Negeri Jember

Jalan Mastrip, Kecamatan Sumbersari, Kabupaten Jember 68121

*)Penulis untuk korespondensi E-mail: rijaldaivu3@gmail.com

Diajukan: 30 April 2024 **/Diterima:** 20 November 2024 **/Dipublikasi:** 29 November 2024

ABSTRACT

*In Indonesia, the traditional techniques of grafting continue to be utilized for the multiplication of cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) in order to produce plant seeds. This method has numerous disadvantages, including requiring a vast space, plenty of labor, and the seeds produced are relatively diverse. Based on this, it is required to do research to obtain cocoa plant seeds through unconventional, more effective methods. This procedure can be accomplished by tissue culture. The tissue culture process has many stages. One of the initial stages that supports success in tissue culture is the induction of embryogenic callus. This stage is carried out to obtain good embryogenic callus potential. The aim of the research was to conduct specific identification of embryogenic callus from young leaves and flower buds of Sulawesi 01 cocoa clone. The method used was specific identification with an Olympus stereo microscope. The identified callus was an outcome of embryogenic callus induction from flower buds and the young leaves of Sulawesi clone 01 cocoa plants. Observation variables consist of the nature, texture, and color of callus. The research results showed that cocoa flower buds experienced callus development faster than young cocoa leaves, as evidenced by the presence of the heart phase. The crumb structure, white and blackish brown color indicate the recommended embryogenic callus.*

Keywords: *cocoa; embryogenic callus; identification; Sulawesi clone 01*

INTISARI

Perbanyak tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) di Indonesia masih sering dilakukan secara konvensional, seperti okulasi untuk mendapatkan bibit tanaman. Cara ini memiliki banyak kelemahan, diantaranya membutuhkan areal yang luas, tenaga kerja yang banyak, dan bibit yang dihasilkan relatif beragam. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan bibit kakao dengan cara *non* konvensional yang lebih efektif. Cara tersebut dapat dilakukan melalui kultur jaringan. Pada prosesnya kultur jaringan memiliki tahapan yang panjang. Salah satu tahapan awal yang menunjang keberhasilan dalam kultur jaringan adalah induksi kalus. Tahapan ini dilakukan untuk mendapatkan potensi kalus embriogenik yang baik. Adapun tujuan dalam penelitian adalah melakukan identifikasi spesifik terhadap kalus embriogenik asal daun muda dan kuncup bunga kakao klon Sulawesi 01. Metode yang digunakan adalah identifikasi spesifik menggunakan mikroskop stereo Olympus. Kalus yang diidentifikasi merupakan hasil dari proses induksi kalus asal eksplan kuncup bunga dan daun muda kakao klon Sulawesi 01. Variabel pengamatan terdiri dari sifat,

tekstur, dan warna kalus. Hasil penelitian menunjukkan kuncup bunga kakao lebih cepat mengalami perkembangan kalus dibandingkan daun muda kakao, dibuktikan dengan adanya fase *heart*. Struktur remah, warna putih dan coklat kehitaman menunjukkan kalus embriogenik yang direkomendasikan.

Kata kunci: identifikasi; kakao; kalus embriogenik; klon Sulawesi 01

PENDAHULUAN

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas tanaman perkebunan primadona di Indonesia. Secara umum kakao dibudidayakan di Indonesia melalui perbanyakan konvensional, salah satunya adalah okulasi. Sampai saat ini cara okulasi paling banyak digemari oleh petani kakao, karena dapat memperbaiki karakteristik asal dari kakao yaitu meningkatkan bobot kering biji per hektar dan jumlah buah yang dihasilkan per pohon (Wahyudi, 2021). Walaupun demikian cara ini masih banyak memiliki kelemahan, diantaranya membutuhkan areal yang luas, tenaga kerja yang banyak, dan tingkat keragaman pada bibit yang tinggi (Hendriyani *et al.*, 2020). Kelemahan-kelemahan tersebut dapat dihindari, ketika perbanyakan kakao dilakukan secara kultur jaringan. Kelebihan utama dari kultur jaringan adalah menghasilkan bibit dengan karakteristik yang unggul seperti induknya (Sari *et al.*, 2018), sehingga bibit ini mampu memperbaiki kualitas bibit yang dihasilkan secara konvensional. Kultur jaringan merupakan salah satu cara perbanyakan tanaman modern untuk menghasilkan bibit dalam skala besar dan unggul (Harahap *et al.*, 2019). Keberhasilan dalam kultur jaringan sangat ditentukan oleh tahapan awal dalam

pelaksanaannya. Tahapan yang dimaksud adalah induksi kalus yang bertujuan mengarahkan kalus untuk mengalami diferensiasi perkembangan kalus, seperti fase globular, *heart*, dan torpedo (Pardede *et al.*, 2021). Induksi kalus dapat dilakukan menggunakan bagian tanaman sebagai sumber eksplan yang bersifat meristematis, seperti tunas apikal atau lateral, kuncup bunga, daun muda, dan biji (Rizal *et al.*, 2017).

Pada kultur jaringan peran klon juga penting untuk diperhatikan, karena berkaitan erat terhadap bibit yang dihasilkan. Pada penelitian ini sumber eksplan berasal dari kakao klon Sulawesi 01, karena memiliki produktivitas yang tinggi 2,5 ton/ha/tahun, tahan terhadap penyakit *Vascular Streak Dieback* (VSD), dan toleran terhadap cekaman kekeringan (Kementerian Pertanian Republik Indonesia, 2015). Selain itu kakao klon Sulawesi 01 juga masih menjadi salah satu klon yang dibudidayakan oleh petani kakao di Indonesia utamanya di Pulau Sulawesi (Sabahannur *et al.*, 2023), sehingga ketersediaan dan kemurniannya perlu diperhatikan juga dipertahankan. Berdasarkan hal tersebut, perbanyakan secara kultur jaringan penting untuk dilakukan pada kakao klon Sulawesi 01.

Tahapan induksi kalus penting dilakukan pada kultur jaringan kakao yang menggunakan eksplan seperti daun muda dan kuncup bunga, karena kedua asal eksplan tersebut secara alami tidak memiliki bakal tunas seperti eksplan yang berasal dari tunas apikal dan lateral. Berdasarkan kondisi tersebut, tahapan induksi kalus menjadi sarana penting untuk mendapatkan tunas adventif secara tidak langsung (Girsang *et al.*, 2023). Salah satu hal lain yang perlu diperhatikan dalam tahapan induksi kalus adalah kesesuaian tingkat konsentrasi ZPT, karena peranya dapat mempercepat ataupun sebaliknya yaitu memperlambat pembentukan kalus.

Kalus yang diperoleh dari tahapan induksi kalus, tidak seluruhnya mengalami perkembangan kalus yang sempurna dan seragam. Pada penelitian Juliana *et al.* (2019) menyatakan bahwa induksi kalus eksplan tanaman manggis menghasilkan kalus pada fase yang beragam yaitu globular, *heart*, dan torpedo. Hasil penelitian lain juga menunjukkan bahwa eksplan tanaman porang yang diinduksi dengan pemberian ZPT NAA 1 mg L⁻¹ dan 2,4-D 2 mg L⁻¹ menghasilkan kalus pada fase yang berbeda (Farlisa *et al.*, 2022). Berdasarkan hal tersebut maka diperlukan identifikasi untuk mendapatkan informasi spesifik dari kalus yang dihasilkan. Secara umum identifikasi kalus dilakukan untuk mendapatkan informasi terkait sifat kalus, tekstur kalus, dan warna kalus. Sifat kalus dibedakan menjadi dua, yaitu embriogenik dan *non* embriogenik. Kalus embriogenik adalah kondisi kalus yang

memiliki performa baik untuk berdiferensiasi dan berkembang menjadi planlet. Sifat ini dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti genotipe, konsentrasi gula, dan ZPT endogen juga eksogen (Wahyuni *et al.*, 2020). Sedangkan tekstur kalus berhubungan erat dengan struktur dari kalus. Kalus dengan tekstur lunak akan memiliki struktur remah dan kalus dengan tekstur keras atau padat akan memiliki struktur kompak (Wulandari *et al.*, 2022). Terakhir adalah warna kalus yang dapat memberikan gambaran kondisi dari kalus, seperti warna putih cerah yang menunjukkan kalus sehat dan memiliki sel-sel aktif membelah (Rahayu & Suharyanto, 2020). Informasi tersebut memiliki peranan penting sebagai pertimbangan penggunaan kalus pada tahapan berikutnya. Adapun tujuan dalam penelitian ini adalah melakukan identifikasi spesifik terhadap kalus embriogenik asal daun muda dan kuncup bunga kakao klon Sulawesi 01.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan selama 2 bulan, yaitu bulan April sampai Mei 2023 di Laboratorium Kultur Jaringan dan Teknologi Benih, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember. Alat yang digunakan, diantaranya cawan petri ukuran 150 x 15 mm (*merk Biologix*) 4 buah, pinset splinter (*merk Apollo*) dan anatomis masing-masing 2 buah, scalpel standar 2 buah dan blade (*size* 11) 2 buah, mikroskop stereo perbesaran maksimal 6,5 x 10 (*merk Olympus*) 1 unit, dan batang ose dengan

ujung bulat 3 buah. Sedangkan bahan yang digunakan adalah kalus dari eksplan kuncup bunga dan daun muda kakao (*Theobroma cacao* L.) klon Sulawesi 01 yang telah diinduksi selama 5 Minggu pada media kultur *Murashige and Skoog* dengan penambahan ZPT 2,4-D 0,5 mg L⁻¹.

Metode penelitian yang digunakan adalah identifikasi spesifik terhadap objek teliti. Identifikasi dilakukan menggunakan mikroskop stereo pada perbesaran 0,8 x 10; 1,25 x 10; 1,6 x 10; 2 x 10; 2,5 x 10; dan 4 x 10. Identifikasi diawali dengan persiapan alat dan bahan, kemudian mengeluarkan kalus dari dalam botol kultur menggunakan pinset dan batang ose. Selanjutnya kalus dipindahkan ke dalam cawan petri dan dilakukan pemotongan dengan ukuran 5 mm sampai 1 cm menggunakan pisau scalpel. Setelah itu, dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran tertentu sampai kalus yang diamati benar-benar dapat diidentifikasi

secara spesifik. Terakhir dilakukan pencatatan dan dokumentasi terhadap objek teliti.

Variabel pengamatan dalam penelitian, diantaranya sifat kalus, tekstur, dan warna kalus. Ketiga variabel pengamatan tersebut dilakukan identifikasi secara deskriptif menggunakan bantuan mikroskop stereo Olympus. Pada variabel pengamatan sifat kalus dilakukan identifikasi untuk mengetahui fase perkembangan dari kalus. Fase perkembangan yang dimaksud, yaitu *Pro Embryo Mass* (PEM), *globular*, *heart*, dan *torpedo*. Sedangkan pada variabel pengamatan tekstur kalus dilakukan identifikasi untuk mengetahui kondisi permukaan dari kalus, seperti lunak dan keras atau padat. Terakhir yaitu pada variabel pengamatan warna kalus dilakukan identifikasi untuk mengetahui warna spesifik dari kalus dengan sistem skoring sesuai Tabel 1.

Tabel 1. Skoring warna kalus

Skor	Deskripsi Warna pada Kalus	Simbol
Nol atau Satu	Kalus mati atau berwarna hitam	M/H
Dua	Kalus berwarna coklat kehitaman.	CK
Tiga	Kalus berwarna kuning kecoklatan.	KK
Empat	Kalus berwarna putih kekuningan.	PK
Lima	Kalus berwarna putih.	P
Enam	Kalus berwarna hijau kekuningan.	HK
Tujuh	Kalus berwarna hijau.	H

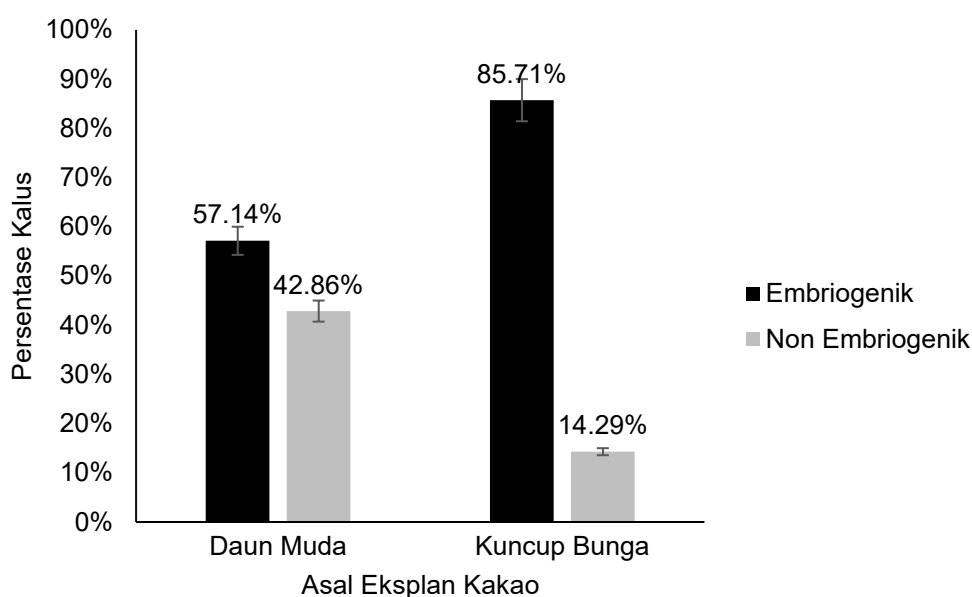
Sumber: Kadir (2006) dalam Wulandari et al. (2022)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat Kalus

Kalus merupakan kumpulan dari sel yang bersifat amorf dan terus mengalami pembelahan. Kalus dapat dihasilkan dari proses induksi bagian tanaman tertentu, seperti daun, bunga, tangkai, tunas, dan biji yang disebut sebagai eksplan. Eksplan yang diinduksi secara *in vitro* memiliki respon terhadap pembentukan kalus yang berbeda-beda, meliputi sifat, jenis, struktur, dan karakteristik lainnya (Maulana *et al.*, 2019). Induksi kalus dilakukan untuk mendorong pembentukan embrio somatik secara tidak langsung, harapannya diperoleh kalus dengan sifat embriogenik. Menurut Egertsdotter (2019) kalus yang bersifat embriogenik berasal dari sel-sel meristematis yang memiliki ruang antar sel atau disebut

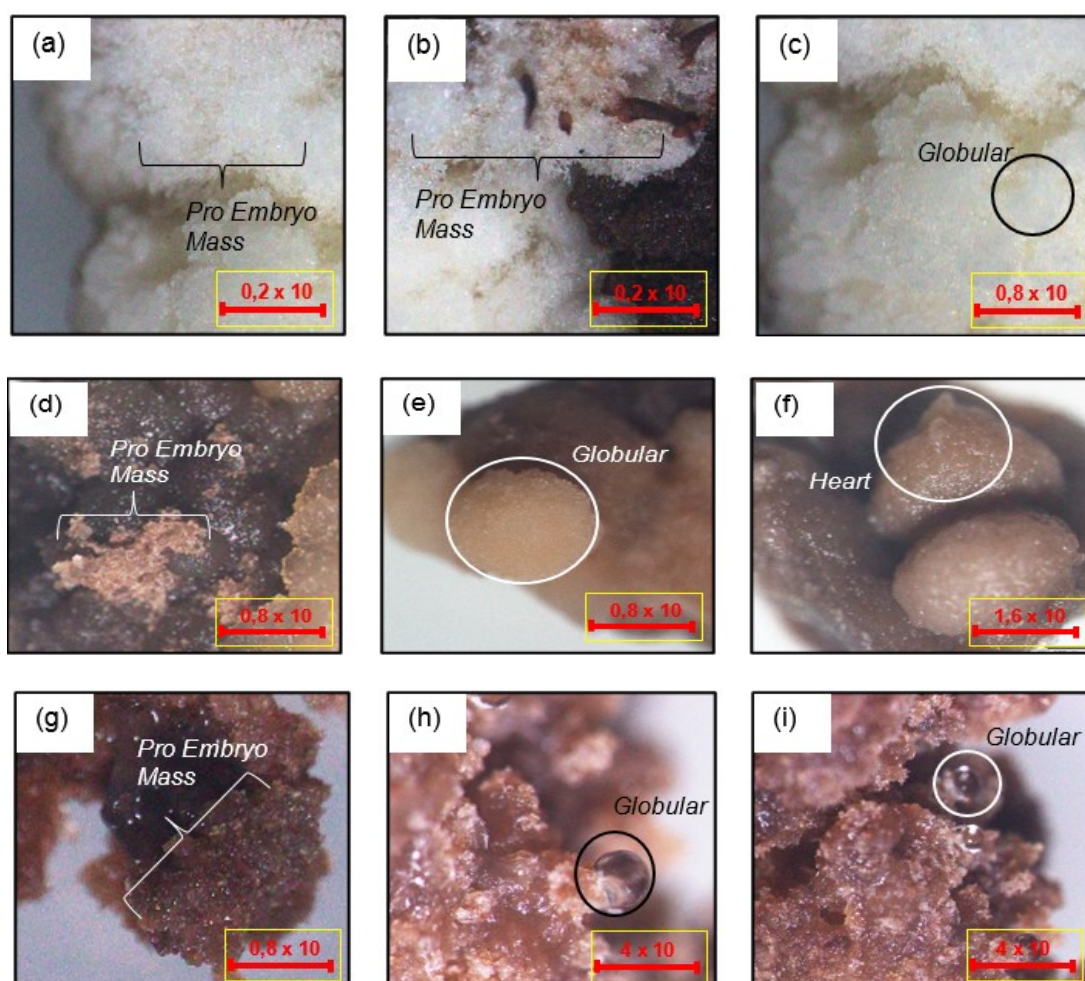
dengan *Pro Embryo Mass* (PEM). Sedangkan menurut Admojo *et al.* (2014) kalus yang bersifat embriogenik memiliki warna mengkilap, remah, dan sitoplasma padat ketika diamati menggunakan mikroskop. Selain itu kalus embriogenik juga memiliki kemampuan proliferasi untuk berkembang menuju fase-fase kalus (Oktafiana *et al.*, 2022). Fase perkembangan dari kalus embriogenik dimulai dari PEM, globular, *heart*, dan torpedo. Pada penelitian ini didapati bahwa dari 14 unit satuan percobaan, sebanyak 4 unit satuan percobaan (57,14%) eksplan daun muda kakao yang berkalus bersifat embriogenik dan 6 unit satuan percobaan (85,71%) eksplan kuncup bunga kakao yang berkalus bersifat embriogenik (Gambar 1).



Gambar 1. Kalus embriogenik dan *non* embriogenik pada eksplan kakao klon Sulawesi 01

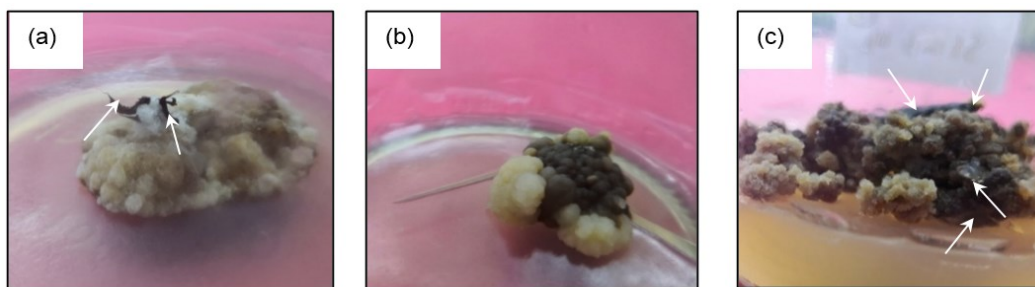
Menurut Farlisa et al. (2022) kalus yang berkembang pada fase globular dicirikan dengan adanya nodul berbentuk bulat dengan bagian apikal lebih kecil dibandingkan bagian basal. Kalus pada fase globular juga dicirikan dengan struktur remah yang menunjukkan susunan antar sel renggang (Sugiyarto & Kuswandi, 2014; Wulandari et al., 2022). Struktur tersebut memberikan kemampuan kalus untuk lebih mudah dalam memisahkan sel-sel tunggalnya (Rasud & Bustaman, 2020). Selain itu struktur remah juga dapat

meningkatkan aerasi oksigen antar sel pada kalus, sehingga mempermudah sel-sel kalus dalam memperbanyak diri. Sedangkan kalus yang berkembang pada fase *heart* dicirikan dengan bentuk spesifik menyerupai jantung, dengan bagian ujungnya memanjang dan sedikit meruncing yang menunjukkan adanya diferensiasi sel. Selain itu, kalus juga memiliki fase torpedo yaitu fase dengan bentuk hampir menyerupai kecambah. Pada fase ini bagian basal sedikit lebih kecil dibandingkan bagian apikal (Admojo et al., 2014).



Keterangan: Kalus embriogenik asal eksplan kuncup bunga kakao ditunjukkan huruf (a), (b), (c), (d), (e), dan (f), sedangkan kalus embriogenik asal daun muda kakao ditunjukkan huruf (g), (h), dan (i).

Gambar 2. Identifikasi secara mikroskopis pada kalus embriogenik eksplan kakao klon Sulawesi 01 menggunakan mikroskop stereo Olympus



Keterangan: Garis panah warna putih menunjukkan letak: (a) Bagian kuncup bunga kakao dan (b) Helai daun muda kakao klon Sulawesi 01 yang tidak berkalus.

Gambar 3. Identifikasi secara fisik kalus pada eksplan asal: (a) dan (b) Kucup bunga; (c) Daun muda kakao klon Sulawesi 01

Berdasarkan identifikasi secara fisik pada Gambar 3. (a) dan (c) menunjukkan bagian eksplan yang berkalus lebih banyak dibandingkan bagian yang tidak berkalus, sedangkan pada Gambar 3. (b) menunjukkan seluruh bagian eksplan berkalus. Tumbuhnya kalus pada eksplan dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti asal eksplan, jenis ZPT, dan kondisi lingkungan. Pada umumnya eksplan yang digunakan untuk kultur jaringan dipilih dari bagian tanaman yang muda, karena di dalamnya terdapat jaringan meristem dengan sel-sel yang masih aktif membelah. Jenis ZPT yang ditambahkan pada media kultur, juga dapat mempengaruhi performa eksplan untuk berkalus. Penambahan ZPT 2,4-D $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ pada media kultur induksi daun binahong merah memberikan nilai rata-rata persentase berkalus lebih besar yaitu 50%, dibandingkan media kultur yang tidak ditambahkan ZPT 2,4-D yaitu 12,50% (Silvina *et al.*, 2021). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yaitu penambahan ZPT 2,4-D $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ pada media kultur *Murashige and Skoog* dapat mendorong terbentuknya kalus pada eksplan

kakao klon Sulawesi 01. Selain itu kondisi lingkungan yang steril dan terkendali juga turut serta meningkatkan performa eksplan untuk berkalus, karena jika kondisi lingkungan tidak steril akan menghambat eksplan untuk berkalus.

Tekstur Kalus

Tekstur merupakan karakteristik dari permukaan kalus secara fisik, seperti lunak dan keras atau padat. Tekstur kalus perlu untuk diketahui, karena memiliki hubungan erat terhadap kondisi kalus. Berdasarkan hal tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan identifikasi terhadap tekstur kalus. Hasil penelitian (Tabel 2) menunjukkan tekstur kalus eksplan daun muda kakao cenderung keras atau padat dengan nilai rata-rata 1. Tekstur ini merupakan dampak dari adanya lignifikasi (Wulandari *et al.*, 2022). Sedangkan pada kalus eksplan kuncup bunga kakao cenderung lunak ditunjukkan dengan nilai rata-rata 2. Tekstur lunak biasanya dimiliki oleh kalus dengan kandungan air yang sedikit, memiliki struktur remah, dan mudah dipisahkan (Sugiarto & Kuswandi, 2014).

Tabel 2. Tekstur dan warna kalus pada eksplan kakao klon Sulawesi 01

Unit Percobaan ke-	Tekstur Kalus		Warna Kalus		Sifat Kalus
	Simbol	Skor	Simbol	Skor	
Asal Eksplan Daun Muda					
1	K/P	1	CK	3	Non Embriogenik
2	K/P	1	CK	3	Embriogenik
3	K/P	1	CK	3	Non Embriogenik
4	L	2	CK	3	Embriogenik
5	L	2	CK	3	Embriogenik
6	K/P	1	CK	3	Non Embriogenik
7	L	2	CK	3	Embriogenik
Rata-Rata		1		2	
Asal Eksplan Kuncup Bunga					
1	L	2	P	5	Embriogenik
2	K/P	1	CK	2	Embriogenik
3	K/P	1	H	1	Non Embriogenik
4	L	2	P	5	Embriogenik
5	L	2	PK	4	Embriogenik
6	L	2	CK	2	Embriogenik
7	K/P	1	CK	2	Embriogenik
Rata-Rata		2		3	

Keterangan: - Simbol dan skor pada warna kalus sesuai pada Tabel 1;
 - Simbol pada tekstur kalus: (1) Keras atau padat (K/P) dan (2) Lunak (L);
 - Skor pada tekstur kalus: (1) Jika kalus memiliki tekstur keras atau padat diberikan skor 1 dan (2) Jika kalus memiliki tekstur lunak diberikan skor 2.

Pada Tabel 2 tekstur lunak hanya dimiliki oleh kalus embriogenik yang banyak dihasilkan eksplan kuncup bunga kakao. Hal ini dapat terjadi karena eksplan kuncup bunga kakao diambil ketika masih berumur \pm 5-10 hari. Pada umur tersebut bunga kakao berada pada fase primordia, yaitu fase ketika sel-selnya sedang aktif mengalami pembelahan dan diferensiasi. Sedangkan pada eksplan daun muda kakao lebih banyak memiliki kalus bertekstur keras atau padat. Adapun penyebabnya, yaitu karena berhentinya aktivitas proliferasi yang terjadi pada sel-sel kalus dan adanya hormon auksin endogen berlebih yang diproduksi eksplan (Wahyuni *et al.*, 2020). Pada umumnya eksplan dengan tekstur keras atau padat memiliki struktur kompak.

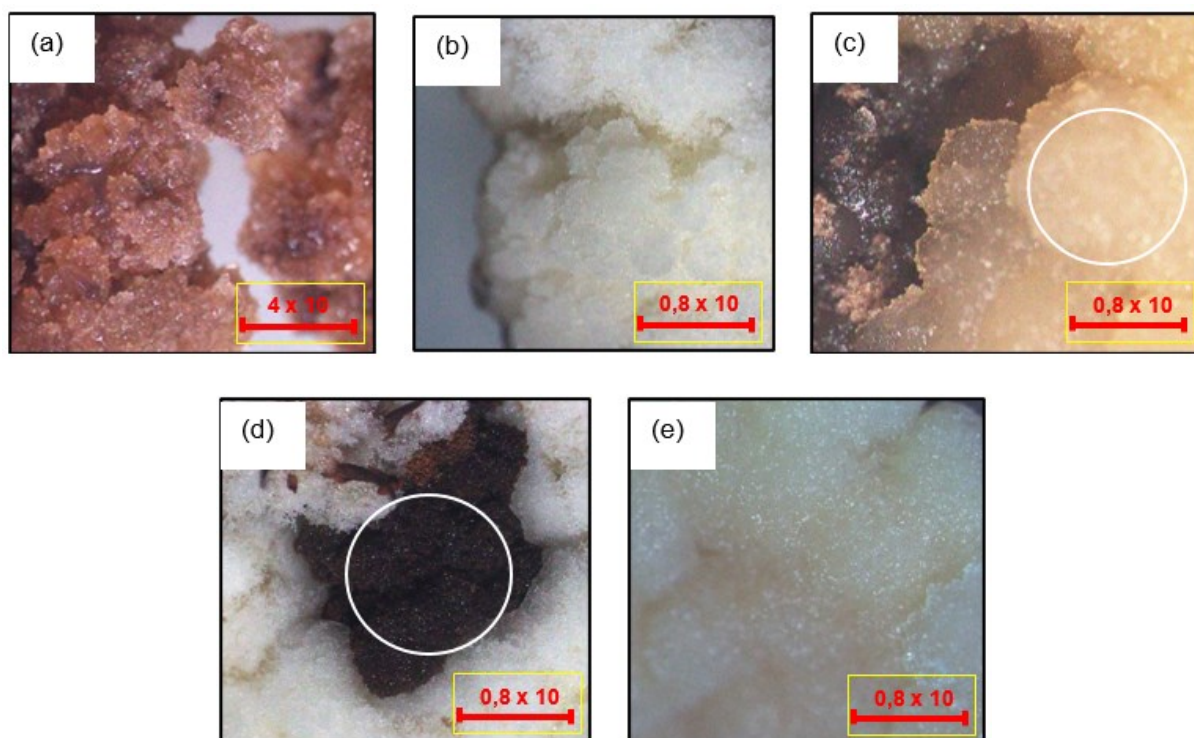
Warna Kalus

Karakteristik lain yang dapat memberikan informasi dari kalus adalah warna. Kalus memiliki variasi warna spesifik, seperti hitam, coklat kehitaman, kuning kecoklatan, putih kekuningan, putih, hijau kekuningan, dan hijau (Wulandari *et al.*, 2022). Menurut Rahayu & Suharyanto (2020) perbedaan warna pada kalus dapat dipengaruhi oleh jenis kandungan pigmen pada eksplan. Secara umum kalus dengan warna gelap memiliki sel-sel tidak aktif membelah. Sebaliknya kalus dengan warna cerah seperti putih, kuning, dan hijau memiliki sel-sel aktif membelah dan kandungan pigmen yang banyak, sehingga mudah mengalami diferensiasi dan perkembangan (Wulandari *et al.*, 2022). Namun pada penelitian Claudia (2016) dalam Wahyuni *et al.* (2020) melaporkan bahwa kalus eksplan

kakao dengan warna gelap yaitu coklat cenderung lebih cepat berkembang yaitu menuju fase globular, dibandingkan kalus berwarna terang yang tidak menunjukkan adanya perkembangan. Kondisi tersebut sejalan dengan hasil penelitian ini yang menunjukkan perkembangan fase kalus globular dan *heart* didominasi oleh kalus dengan warna kurang terang yaitu coklat kehitaman (Gambar 2).

Hasil skoring warna kalus pada eksplan kakao klon Sulawesi 01 yang berasal dari daun muda dan kuncup bunga menunjukkan nilai rata-rata yang sama yaitu 3 atau coklat kehitaman (Tabel 2). Kecenderungan warna tersebut akibat penambahan ZPT 2,4-D 0,5 mg L⁻¹ pada media kultur. Kondisi ini dapat diperkuat dengan hasil penelitian yang

melaporkan kalus eksplan daun tempuyung memiliki kecenderungan warna coklat sebagai akibat dari penambahan ZPT 2,4-D 0,5 mg L⁻¹ (Rahayu & Suharyanto, 2020). Walaupun demikian, kalus eksplan kuncup bunga kakao memiliki warna yang lebih beragam, dibandingkan dengan warna kalus eksplan daun muda kakao yang hanya coklat kehitaman (Gambar 4). Hasil ini menunjukkan adanya pengaruh asal eksplan terhadap warna kalus. Menurut Novianti et al. (2012) eksplan asal kelopak bunga rosela dapat memiliki warna cerah seperti putih dan kuning, disebabkan oleh nilai rata-rata kandungan karotenoid yang lebih tinggi (246,88 mg L⁻¹) dibandingkan eksplan daun rosela (33,24 mg L⁻¹).



Gambar 4. Kalus eksplan daun muda kakao warna: (a) Coklat kehitaman dan kalus eksplan daun muda kakao warna: (b) Putih, (c) Coklat kehitaman, (d) Hitam, (e) Putih kekuningan

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mengidentifikasi secara spesifik perkembangan kalus embriogenik eksplan asal kuncup bunga dan daun muda kakao klon Sulawesi 01. Eksplan asal kuncup bunga dan daun muda kakao menunjukkan respon yang berbeda terhadap proses induksi kalus. Eksplan kuncup bunga kakao mengalami perkembangan kalus yang lebih cepat dibandingkan eksplan daun muda kakao, dibuktikan dengan adanya fase *heart* pada kalus eksplan kuncup bunga kakao. Kalus embriogenik yang dihasilkan memiliki karakteristik tekstur dan warna yang bervariasi, antara lain tekstur lunak dengan struktur remah hingga tekstur keras atau padat dengan struktur kompak, serta warna kalus dari hitam hingga putih. Penggunaan kuncup bunga kakao klon Sulawesi 01 sebagai eksplan lebih direkomendasikan, karena menunjukkan potensi embriogenik yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Admojo, L., Indrianto, A., & Hadi, H. 2014. Perkembangan Penelitian Induksi Kalus Embriogenik pada Jaringan Vegetatif Tanaman Karet Klonal (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). *Warta Per karetan*. 33 (1):19–28.
- Egertsdotter, U. 2019. Plant Physiological and Genetical Aspects of the Somatic Embryogenesis Process in Conifer. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 35 (5):360–369.
- Farlisa, V. Y., Dewanti, P., Hariyono, K., Handoyo, T., & Restanto, D. P. 2022. Induksi *Somatic Embryogenesis* dan Kultur Suspensi Sel pada Tanaman Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume). *Agriprima: Journal of Applied Agricultural*. 6 (2):111–123.
- Girsang, I. E., Restiani, R., & Prasetyaningsih, A. 2023. Induksi Kalus Eksplan Daun Porang (*Amorphophallus muelleri* Blume) Menggunakan Kombinasi Air Kelapa dan IAA (*Indole Acetic Acid*). *Sciscitatio*. 4 (2):65–76.
- Harahap, F., Hasanah, A., Insani, H., Harahap, N. K., Pinem, M. D., Edi, S., Sipahutar, H., & Silaban, R. 2019. *Kultur Jaringan Nanas*. Media Sahabat Cendekia. Surabaya.
- Hendriyani, E., Warseno, T., & Udaharta, N. K. E. 2020. Pengaruh Jenis Eksplan dan Kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) terhadap Induksi Kalus *Begonia bimaensis* secara *In Vitro*. *Buletin Kebun Raya*. 23 (1):82–90.
- Juliana, T., Isda, M. N., & Iriani, D. 2019. Embriogenesis Somatik dari Kalus Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Asal Bengkulu dengan Pemberian BAP dan Madu secara *In Vitro*. *Al-Kaunyah: Jurnal Biologi*. 12 (1):8–17.
- Kementerian Pertanian Republik Indonesia. 2015. *Produksi, Sertifikasi, Peredaran dan Pengawasan Benih Tanaman Kakao (Theobroma cacao L.)*. Diakses pada 19 Juni 2023.
- Maulana, R., Restanto, D. P., & Slameto, S. 2019. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D terhadap Induksi Kalus Tanaman Sorgum (*Sorgum bicolor* (L.) Moench). *Jurnal Bioindustri*. 1 (2):138–148.

- Noviati, A., Nurchayati, Y., & Setiari, N. 2012. Respon Pertumbuhan dan Produksi Senyawa Antioksidan pada Kalus Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) dari Eksplan yang Berbeda secara *In Vitro*. *Bioma: Berkala Ilmiah Biologi*. 14 (2):85–90.
- Oktafiana, N., Umayyah, S., Ningtyas, W. N., & Sugiharto, B. 2022. Regenerasi Kalus Embriogenik Sorgum (*Sorghum bicolor*) Menggunakan Kombinasi ZPT dan Mikronutrien. *Agriprima: Journal of Applied Agricultural Sciences*. 6 (1):54–61.
- Pardede, Y., Mursyanti, E., & Sidharta, B. R. 2021. Pengaruh Hormon terhadap Induksi Embrio Somatik Kacaping (*Gardenia jasminoides*) dan Potensi Aplikasinya dalam Pembuatan Benih Sintetik. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. 6 (3):162–177.
- Rahayu, S., & Suharyanto. 2020. Induksi Kalus dengan 2, 4-D dan BAP pada Eksplan Daun Vegetatif dan Generatif Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.). *Bioeksakta: Jurnal Ilmiah Biologi Unsoed*. 2 (3):479–486.
- Rasud, Y., & Bustaman, B. 2020. Induksi Kalus secara *In Vitro* dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 25 (1):67–72.
- Rizal, S., Murdiono, E., & Nihayati, E. 2017. Pengaruh Pemberian Beberapa Konsentrasi Kinetin Terhadap Induksi Tunas Aksilar Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) secara *In Vitro*. *Jurnal Produksi Tanaman*. 5 (9):1512–1517.
- Sabahannur, S., Syam, N., & Ervina, E. 2023. Mutu Fisik dan Kimia Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.) pada Beberapa Jenis Klon. *Agrotek: Jurnal Ilmiah Ilmu Pertanian*. 7 (2):99–107.
- Sari, S. I. P., Murdiono, W. E., & Barunawati, N. 2018. Perbanyak Bibit Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* L.) secara *In Vitro*. *Plantropica: Journal of Agriculture Science*. 3 (1):54–61.
- Silvina, F., Isnaini, I., & Ningsih, W. 2021. Induksi Kalus Daun Binahong Merah (*Basella rubra* L.) dengan Pemberian 2, 4-D dan Kinetin. *Jurnal Agro*. 8 (2):274–286.
- Sugiyarto, L., & Kuswandi, P. C. 2014. Pengaruh 2,4-Diklorofenoksiasetat dan Benzyl Aminopurin terhadap Pertumbuhan Kalus Daun Binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta Analisis Kandungan Flavonoid Total. *Jurnal Penelitian Saintek*. 19 (1):23–30.
- Wahyudi, R. U. 2021. *Keragaan Anatomis dan Hasil Beberapa Klon Kakao (Theobroma cacao L.) yang Direhabilitasi dengan Teknik Okulasi Cincin*. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Wahyuni, A., Satria, B., & Zainal, A. 2020. Induksi Kalus Gaharu dengan NAA dan BAP secara *In Vitro*. *Agrosains: Jurnal Penelitian Agronomi*. 22 (1):39–44.
- Wulandari, M., Abdullah, & Netty. 2022. Ketahanan Kalus Embrio Kedelai (*Glycine max* L.) terhadap Tekanan Salinitas (NaCl) secara *In Vitro*. *Jurnal Techno Eco Farming*. 2 (1):8–21.