

## Induksi Kalus Klon Kakao (*Theobroma cacao* L) Sulawesi 2 Pada Medium MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa

Urfiana<sup>1</sup>, Haliana<sup>2</sup>, Muslimin<sup>2</sup>, I Nengah Suwastika<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Lab.Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tadulako. Palu, Sulawesi Tengah

<sup>2</sup>Lab.Kultur Jaringan, Fakultas Kehutanan, Universitas Tadulako. Palu, Sulawesi Tengah

### ABSTRACT

Sulawesi 2 cacao clone is one of the clones which grown by local farmer in Central Sulawesi. One problem in cacao development in this time is the availability of high quality of seeds. One possible way in overcoming of this problem is through the application of tissue culture techniques via embryogenesis. The early stages of embryogenesis is callus induction, which aim to get emryonic callus cells and it can be a model in cacao research. This study was conducted over March and June 2013 in the Tissue Culture Laboratory, Faculty of Forestry Tadulako University. Explant that used was Stamen of flower of Sulawesi 2 cacao clone. This experiment was based on a complete randomized design (CRD) with 4 treatments, and it were repeated 3 times. On every single unit was growth 10 of explants. Different medium as treatments tested were: MS0 + 2 ppm 2,4-D + (15%) Coconut water (MK1), MS0 + 2 ppm 2,4-D + 0.2 ppm BAP + (15%) Coconut water (MK2) , MS0 + 3 ppm 2,4-D + (15%) coconut water (MK3), ms0 + 3 ppm 2,4-D + 0.2 ppm BAP + (15%) coconut water (MK4). Callus development were observed based on the emergence of callus, the percentage of explants producing callus, and cell callus morphology. Callus induction was done under dark condition and temperature of 26° C. The results showed that all of the tested treatments can induce the callus of cacao. The best medium was MS medium + 3 ppm 2,4-D + (15%) Coconut water (MK3), characterized by the appearance of white, callus in intermediate-type, the callus mass was relatively larger than its under others treatments. Under this treatment, explant can produce uniform-relatively big cell and active in proliferation in 10 days after culture.

**Keywords:** MS, 2,4-D, BAP, Coconut Water, Callus Induction, Stamen *Theobroma cacao* L.

### ABSTRAK

Klon kakao Sulawesi 2 merupakan salah satu klon yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat di Sulawesi Tengah. Saat ini kendala yang dihadapi dalam pengembangan kakao adalah ketersediaan bibit, baik kualitas maupun kuantitas. Salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut melalui

teknik kultur jaringan dengan tahap embriogenesis. Tahap awal dari embriogenesis yaitu induksi kalus. Induksi kalus bertujuan untuk mendapatkan kalus yang embrionik dan sebagai model sel dalam penelitian kakao. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai Juni 2013 di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Kehutanan. Universitas Tadulako. Eksplan yang digunakan berupa stamen dari bagian bunga kakao klon unggul Sulawesi 2. Percobaan ini disusun berdasarkan Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan, setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali dan setiap satu unit percobaan menggunakan 10 eksplan. Media tumbuh sebagai perlakuan yang dicobakan adalah : MS0 + 2 ppm 2,4-D + (15%) Air kelapa (MK1), MS0 + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP + (15%) Air kelapa (MK2), MS0 + 3 ppm 2,4-D + (15%) Air kelapa (MK3), MS0 + 3 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP + (15%) Air kelapa (MK4). Parameter yang diamati adalah saat munculnya kalus, persentasi eksplan yang menghasilkan kalus, serta morfologi dan pengamatan sel kalus. Pemeliharaan dilakukan di tempat yang gelap dengan suhu 26 °C. Hasil penelitian menunjukkan semua perlakuan yang dicobakan dapat menginduksi kalus kakao. Medium MS0+ 3 ppm 2,4-D + (15%) Air kelapa (MK3) merupakan media terbaik untuk menginduksi kalus yang ditandai dengan munculnya kalus berwarna putih, bertipe intermediet, massa kalus relatif lebih besar serta memiliki bentuk sel yang besar, seragam dan aktif membelah mulai 10 hari setelah kultur.

**Kata Kunci :** *MS, 2,4-D, BAP, Air Kelapa, Induksi Kalus, Stamen, Theobroma cacao L.*

## I. LATAR BELAKANG

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan jenis tanaman perkebunan penting yang termasuk dalam famili *Sterculiaceae*. Saat ini Indonesia merupakan salah satu negara pembudidaya tanaman kakao paling luas didunia dan termasuk negara penghasil kakao terbesar ketiga setelah Pantai Gading dan Ghana (Wahyudi dkk., 2009).

Di Indonesia, Sulawesi terkenal sebagai daerah penghasil kakao terbanyak dan telah memiliki klon kakao unggul antara lain Sulawesi1 dan Sulawesi2. Luas

areal perkebunan kakao rakyat di Sulawesi Tengah pada tahun 2010 mencapai 224.471 ha dengan total produksi 186.875 ton (BPS, Sulteng, 2011). Dengan demikian tingkat produktivitas kakao yang diusahakan petani di Sulawesi Tengah adalah 0,83 ton/ha/tahun, masih sangat rendah bila dibanding dengan potensi produksi kakao unggul yang mencapai 2-2,5 ton/ha/tahun (Suhendi, dkk., 2004).

Faktor penyebab rendahnya produktivitas kakao di Sulawesi Tengah antara lain adalah adanya serangan hama dan penyakit, penerapan teknologi

Induksi Kalus Klon Kakao (*Theobroma cacao* L) Sulawesi 2 Pada Medium MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa

budidaya yang belum optimal, kondisi tanaman yang sebagian telah tua dan penggunaan jenis (klon) tanaman yang memiliki potensi produksi rendah (Basri, 2010). Melalui teknik kultur jaringan diharapkan kendala tersebut dapat diatasi sehingga diperoleh bahan tanaman dalam jumlah besar dengan kualitas baik dan dalam waktu yang relatif singkat.

Kultur jaringan merupakan suatu teknik mengembangbiakkan bagian tanaman (eksplan) di dalam media buatan yang steril. Kultur jaringan dapat dilakukan dengan dua cara yaitu organogenesis dan embriogenesis. Induksi kalus merupakan tahapan awal pada embriogenesis secara tidak langsung. Kalus adalah kumpulan sel *amorphous* yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus. Tujuan dari adanya kultur kalus adalah untuk mendapatkan kalus yang embrionik dan sebagai model sel dalam penelitian berbagai aspek molekuler dan seluler tumbuhan kakao.

Pada penelitian ini kami mencoba menggunakan stamen bunga kakao klon Sulawesi 2 sebagai eksplant dalam induksi kalus pada media MS dengan penambahan 2,4-D, BAP dan Air kelapa. Dengan metode tersebut, induksi kalus yang aktif berproliferasi dapat diperoleh mulai 10 har setelah tanam.

Induksi Kalus Klon Kakao (*Theobroma cacao* L) Sulawesi 2 Pada Medium MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa

## II. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret 2013 sampai Juni 2013 di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Kehutanan. Universitas Tadulako. Eksplan yang digunakan berupa stamen bunga klon kakao unggul Sulawesi-2 yang masih kuncup dan belum mekar.

Penelitian ini disusun berdasarkan Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan, sehingga terdapat 12 unit percobaan. Setiap unit percobaan menggunakan 10 eksplan sehingga terdapat 120 eksplan. Media tumbuh sebagai perlakuan yang dicobakan adalah:

MK<sub>1</sub> : MS<sub>0</sub> + 2 ppm 2,4-D + Air kelapa (15%)

MK<sub>2</sub> : MS<sub>0</sub> + 2 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP + Air kelapa (15%)

MK<sub>3</sub> : MS<sub>0</sub> + 3 ppm 2,4-D + Air kelapa (15%)

MK<sub>4</sub> : MS<sub>0</sub> + 3 ppm 2,4-D + 0,2 ppm BAP + Air kelapa (15%)

Parameter yang diamati dalam pelaksanaan penelitian ini yaitu saat munculnya kalus, persentase eksplan yang membentuk kalus, morfologi kalus dan pengamatan sel kalus.

Pemeliharaan eksplan dilakukan dengan menyimpan eksplan pada rak kultur dalam keadaan gelap (tanpa cahaya) dengan suhu 26-28 °C.

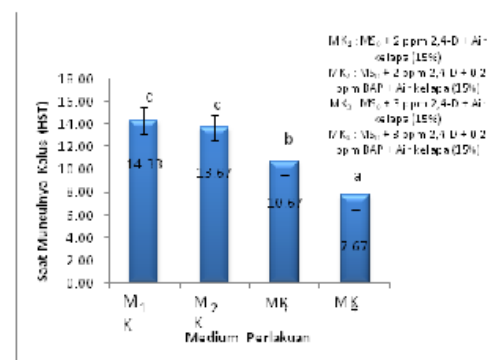
### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian kultur kalus pada eksplan klon kakao Sulawesi-2 menunjukkan bahwa eksplan stamen menghasilkan kalus pada semua perlakuan yang diberikan yaitu pada media MS dengan kombinasi 2,4-D, BAP dan Air kelapa. Pembentukan kalus dapat terjadi pada permukaan eksplan dan luka irisan, serta ditandai dengan pembengkakan pada eksplan dan serbuk-serbuk kecil yang berwarna putih. Hal ini sejalan dengan pernyataan Puspitasari dan Soegihardjo (2002), dari tonjolan kecil yang berada di tepi eksplan akan tumbuh kalus yang berwarna putih dan setelah waktu tertentu kalus akan memenuhi seluruh permukaan eksplan. Kalus akan muncul pada bagian luka irisan, dengan adanya irisan tersebut memudahkan 2,4-D berdifusi ke dalam jaringan tanaman, sehingga 2,4-D yang diberikan akan membantu auksin yang terkandung di dalam jaringan eksplan menstimulasi pembelahan sel terutama sel-sel yang berada di sekitar daerah yang luka (Ulfa, 2011).

Semua perlakuan yang dicobakan dapat menginduksi kalus. Respon pertumbuhan kalus tercepat pada media MK<sub>4</sub> dengan rata-rata 7.67 hari setelah kultur. Sedangkan, eksplan yang memberikan respon paling lambat adalah eksplan pada medium MK<sub>1</sub> dengan rata-

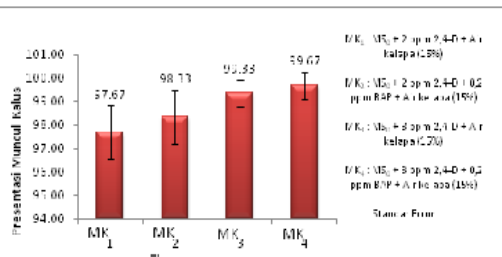
rata 14.33 hari setelah kultur (Gambar 1). Menurut Gunawan (1988), interaksi dan perimbangan antara ZPT yang diberikan ke dalam media dan yang diproduksi oleh sel tanaman secara endogen menentukan arah perkembangan suatu kultur. George dan Sherrington (1984), juga mengemukakan bahwa pertumbuhan dan perkembangan eksplan dipengaruhi oleh interaksi dan keseimbangan antara ZPT eksogen dan ZPT endogen.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, presentasi eksplan yang berkalus dapat dilihat pada Gambar 2. Rata-rata dari presentasi kalus tertinggi pada perlakuan



Gambar 1. Saat Munculnya Kalus

Grafik hubungan antara medium perlakuan dan saat munculnya kalus. Semua perlakuan yang dicobakan dapat menginduksi kalus. Hasil yang diperoleh sangat berbeda nyata. Huruf yang sama di atas grafik menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ taraf 5%. Nilai di dalam grafik menunjukkan rata-rata hasil pengamatan saat munculnya kalus dari empat perlakuan. Pada sisi kanan grafik menunjukkan komposisi media perlakuan yang dicobakan.



**Gambar 2. Persentase Eksplan yang Membentuk Kalus**

Grafik persentase eksplan yang menghasilkan kalus.

Rata-rata dari persentase eksplan yang banyak menghasilkan kalus adalah medium MK<sub>4</sub> dan MK<sub>3</sub>. Nilai angka di atas grafik menunjukkan rata-rata dari persentase eksplan yang menghasilkan kalus. Antar perlakuan tidak menunjukkan perbedaan nyata. Pada sisi kanan grafik menunjukkan komposisi media perlakuan yang dicobakan.

MK<sub>4</sub> (99,67%) dan jumlah persentase kalus terendah adalah perlakuan MK<sub>1</sub> (97,67%). Hal ini diduga pemberian perbedaan konsentrasi 2,4-D yang berbeda, serta penambahan BAP dan Air kelapa, sehingga memberikan respon yang berbeda pula. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Ariati (2012), melaporkan bahwa penambahan 2,4-D, BAP dan Air Kelapa dalam media memberikan respon yang sangat cepat dalam menghasilkan pertumbuhan kalus dari eksplan emrio biji kakao.

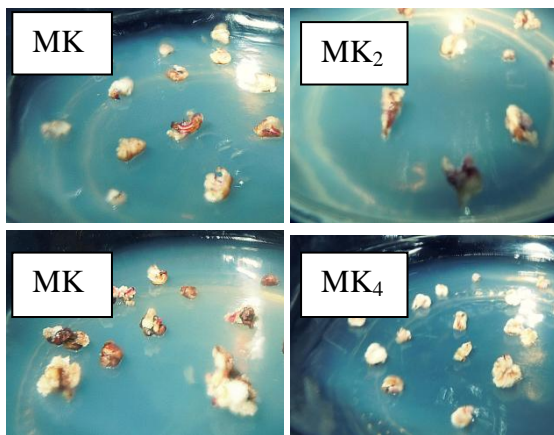
Menurut Gati dan Mariska (1992), 2,4-D efektif untuk memacu pembentukan kalus karena aktifitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Selain itu, hasil penelitian tentang pengaruh asam 2,4-D terhadap pembentukan dan Induksi Kalus Klon Kakao (*Theobroma cacao* L) Sulawesi 2 Pada Medium MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa

pertumbuhan kalus *Acalypha indica* L. menunjukkan bahwa keberadaan BAP dalam media juga mendukung pembentukan kalus (Rahayu dkk, 2002). Menurut Seswita (2010), penambahan air kelapa dalam media inisiasi kalus sangat berpengaruh terhadap saat munculnya kalus dan jumlah persentase kalus yang dihasilkan. Adanya komponen-komponen yang terkandung di dalam air kelapa dapat berinteraksi dengan hormon endogen yang dimiliki oleh setiap eksplan sehingga mampu merangsang pembelahan sel (Surachman, 2011).

Morfologi kalus yaitu bentuk fisik kalus yang dihasilkan dalam setiap perlakuan, dengan melihat warna kalus, dan tipe kalus yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 3 dan Tabel 1. Berdasarkan hasil identifikasi terhadap cirri-ciri kalus, setiap perlakuan menghasilkan kalus dengan cirri-ciri berbeda-beda. Pada pengamatan perlakuan MK<sub>1</sub> dan MK<sub>3</sub> dapat menghasilkan kalus yang lebih baik, karena massa kalus yang dihasilkan relatif lebih besar dan memiliki kalus yang berwarna putih serta bertipe kompak atau intermediet. Sedangkan medium MK<sub>2</sub> dan MK<sub>4</sub> menghasilkan kalus yang berwarna putih, tetapi massa kalus yang dihasilkan kecil dan memiliki tipe kompak. Tipe kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam antara lain, kompak (*non friable*),

intermediet dan remah (*friable*) (Turhan, 2004). Kalus tipe kompak umumnya mempunyai pertumbuhan yang lambat, sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat. Sedangkan tipe kalus yang intermediet mempunyai pertumbuhan yang lebih cepat (Fitriani, 2008). Menurut Pierik (1987), tipe pada kalus dapat bervariasi dari kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur.

Secara visual warna kalus menunjukkan bahwa rata-rata kalus yang terbentuk tiap perlakuan yang dicobakan berwarna putih yang berlangsung  $\pm$  5 minggu. Selanjutnya rata-rata perubahan warna kalus mulai terjadi  $\pm$  6 minggu setelah



Gambar 3. Kalus *Theobroma cacao* L. yang terbentuk dari tiap perlakuan yang dicobakan. Semua perlakuan yang dicobakan menghasilkan kalus berwarna putih dan bertipe kompak atau intermediet.

**Tabel 1. Morfologi Kalus Pada Eksplan *Theobroma cacao* L.**

Tipe Kalus *Theobroma cacao* L. pada Berbagai Perlakuan (8 MSK).

No	Perlakuan	Ulangan		
		1	2	3
1	MK <sub>1</sub>	Intermediet	Intermediet	Kompak
2	MK <sub>2</sub>	Kompak	Kompak	Kompak
3	MK <sub>3</sub>	Kompak	Intermediet	Intermediet
4	MK <sub>4</sub>	Kompak	Kompak	Intermediet

pembentukan kalus dari warnah putih menjadi putih kekuningan dan lama kelamaan berubah menjadi kecoklatan (mengalami penuaan). Bila dibandingkan dengan hasil penelitian Ariati (2012) dari eksplan emrio biji kakao menunjukkan warna kalus yang terbentuk mula-mula berwarna putih yang berlangsung  $\pm$  1 minggu, selanjutnya berubah warna  $\pm$  2 minggu menjadi warna kecoklatan. Adanya perbedaan tersebut sehingga penelitian ini sangat bermanfaat unuk model sel dalam penelitian berbagai aspek molekuler dan seluler tumbuhan kakao. Selain itu dapat dimanfaatkan dalam mempelajari metabolisme dan diferensiasi sel, morfogenesis sel, serta metabolisme sekunder juga merupakan beberapa manfaat dari hasil kultur kalus.

Pengamatan sel kalus dari bagian organ bunga klon *T. cacao* L. yaitu stamen, menunjukkan adanya aktifitas pembelahan sel yang terus menerus (Gambar 4). Pertumbuhan kalus dalam kultur jaringan melibatkan hubungan yang

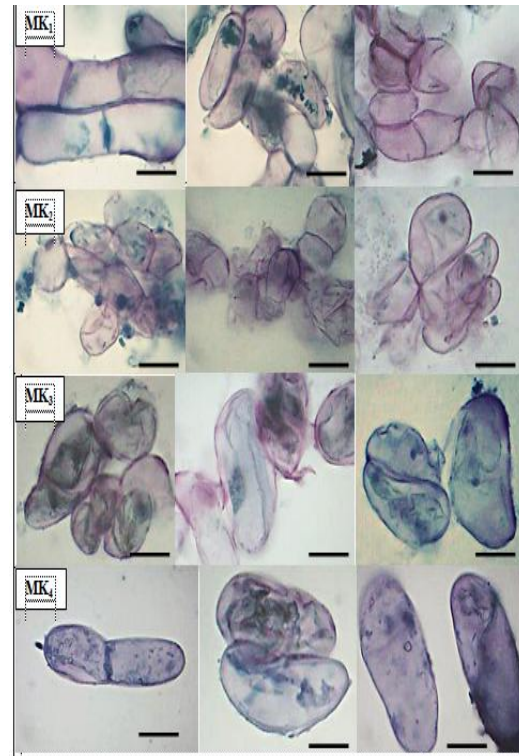
Induksi Kalus Klon Kakao (*Theobroma cacao* L) Sulawesi 2 Pada Medium MS Dengan Penambahan 2,4-D, BAP Dan Air Kelapa

kompleks antara bahan tanam (eksplan) yang digunakan, komposisi media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur selama inkubasi. Rata-rata ukuran sel kalus yang lebih besar diperoleh pada perlakuan MK<sub>4</sub> dengan panjang sel (83.33 µm) dan lebar sel (40 µm), sedangkan ukuran sel kalus yang paling kecil diperoleh pada perlakuan MK<sub>2</sub> dengan panjang sel (33.33 µm) dan lebar sel (20 µm) (Gambar 5 dan 6).

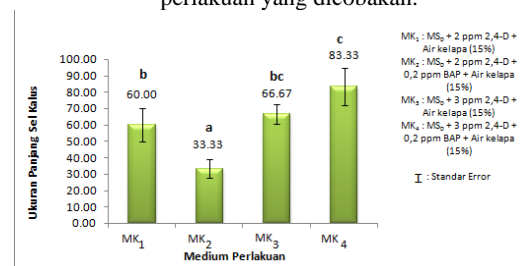
Semua perlakuan yang dicobakan mampu menginduksi kalus kakao. Medium yang terbaik untuk pertumbuhan kalus *T. cacao* adalah medium MS + 3 ppm 2,4-D + (15%) Air kelapa (MK<sub>3</sub>) yang ditandai dengan munculnya kalus berwarna putih, bertipe intermediet, massa kalus relatif lebih besar serta memiliki bentuk sel yang besar, seragam dan aktif membelah mulai 10 hari setelah kultur.

### UCAPAN TERIMAKASIH

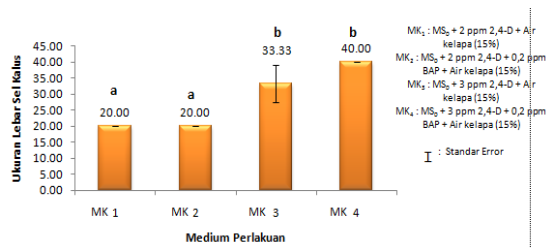
Terima kasih penulis ucapkan kepada ibu Weniati, S.Hut. dan Sdr. Agus Muliadi atas bantuan dan kerjasamanya selama penelitian. Penelitian ini dibantu secara finansial oleh Pusat Studi Bioteknologi pada Lembaga Penelitian UNTAD.



Gambar 4. Bentuk Sel Kalus *Theobroma cacao* L. yang terbentuk pada 8 minggu setelah tanam pada Berbagai Perlakuan. Sel yang dihasilkan memperlihatkan adanya pembelahan sel yang terus menerus. Garis hitam di bawah kanan gambar menunjukkan skala ukuran 20 µm. Huruf pada sisi kiri gambar menunjukkan media perlakuan yang dicobakan.



Gambar 5. Rata-rata Panjang Sel Kalus *Theobroma cacao* L. pada 8 Minggu Setelah Kultur (dalam µm). Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan berbeda sangat nyata terhadap ukuran panjang sel kalus berdasar uji BNJ pada taraf 5%. Nilai di atas grafik menunjukkan rata-rata pengukuran dari empat perlakuan. Pada sisi kanan grafik menunjukkan komposisi media perlakuan yang dicobakan.



Gambar 6. Grafik Rata-rata Lebar Sel Kalus *Theobroma cacao* L. pada 8 Minggu Setelah Kultur (dalam µm). Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata terhadap berdasar uji BNJ pada taraf 5%. Nilai di atas grafik menunjukkan rata-rata pengukuran dari empat perlakuan. Pada sisi kanan grafik menunjukkan komposisi media perlakuan yang dicobakan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ariati, S.N., 2012, Induksi *Tanaman kakao Pada Medium MS dengan Penambahan 2,4-D*, Jurnal Natural Science, Vol. 1.(1) 74-84.
- Badan Pusat Statistik, 2011, *Sulawesi Tengah Dalam Angka*, Kantor Pusat Statistik Provinsi Sulawesi Tengah, Palu.
- Basri, Z., 2010, *Kajian Metode Perbanyakan Klonal Pada Tanaman Kakao*. Media LITBANG SULTENG.
- \_\_\_\_\_, 2004, *Kultur Jaringan Tanaman*, Universitas Tadulako Press, Palu.
- Fitriani, H., 2008, *Kajian Konsentrasi BAP dan NAA terhadap Multiplikasi Tanaman Artemisia annua L. secara In Vitro*, Skripsi Fakultas Pertanian UNS, Surakarta.
- Gati, E dan I, Mariska, 1992, *Pengaruh Auksin Dan Sitokinin Terhadap Pembentukan Kalus Mentha piperita Linn.*, Buletin Littri 3 : 1-4.
- George, E.F dan T.D. Sherrington., 1984, *Plant Propagation by Tissue Culture*. Handbook and Directory of Commercial Laboratories, England.
- Gunawan, L.W., 1988, *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan*, PAU Bioteknologi, Institut pertanian bogor, Bogor.
- Pierik, R. L. M., 1987, *In Vitro Culture of Hinger Plant*, Martinus Nijhoff Publisher, Netherlands.
- Puspitasari, A., dan C, J, Soegihardjo, 2002, *Optimisasi Media Pertumbuhan Kalus Sebagai Langkah Awal Upaya Budidaya In Vitro Tanaman Vitex trifolia L*, Majalah Farmasi Indonesia, 13 (1), 21-25.
- Rahayu, B., Solichatun, dan E, Anggarwulan, 2002, *PengaruhAsam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) Terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultu rKalus Acalypha indica L.*, Jurnal Biofarmasi 1 (1) : 1-6, Februari 2003.
- Seswita, D., 2010, *Penggunaan Aplikasi Air Kelapa Sebagai Zat Pengatur Tumbuh Pada Multiplikasi Tunas Temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb.) In Vitro*,Jurnal Littri 16(4), Desember 2010.
- Suhendi, D., Winarno, H. Dan Susilo, A. W., 2004, *Peningkatan Produksi dan Mutu Hasil Kakao Melalui Penggunaan Klon Unggul Baru*. Prosiding Simposium Kakao 2004, Yogyakarta.
- Surachman, D., 2011, *Teknik Pemanfaatan air kelapa untuk perbanyakan nilamsecara in vitro*, Buletin Teknik



Pertanian Vol. 16, No 1, 2011: 31-33.

Media Litbang Sulteng IV (2) : 137-141, Desember 2011.

Ulfa, M. B., 2011, *Penggunaan 2,4-D Untuk Induksi Kalus Kacang Tanah*,

Wahyudi, T., Panggabean, T. R., dan Pujianto., 2009, *Panduan lengkap Kakao*,. Penebar Swadaya, Jakarta.