

PENGARUH SITOKININ, JENIS EKSPLAN, DAN GENOTIPE TERHADAP EMBRIOGENESIS SOMATIK KAKAO

THE EFFECT OF CYTOKININS, EXPLANT TYPES, AND GENOTYPES ON CACAO SOMATIC EMBRYOGENESIS

* Nur Ajjah¹⁾ dan RR. Sri Hartati²⁾

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar¹⁾

Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia

* jijah_ridwan@yahoo.co.id

Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan²⁾

Jalan Tentara Pelajar No. 1, Bogor 16111 Indonesia

tatiekjoe@yahoo.co.id

(Tanggal diterima: 11 April 2016, direvisi: 12 Mei 2016, disetujui terbit: 1 Juli 2016)

ABSTRAK

Informasi tentang pengaruh sitokinin terhadap pembentukan embrio somatik primer kakao (*Theobroma cacao* L.) serta interaksinya dengan genotipe dan jenis eksplan belum diketahui. Tujuan penelitian adalah mengevaluasi pengaruh sitokinin serta interaksinya dengan jenis eksplan dan genotipe terhadap pembentukan embrio somatik kakao. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian Balitbangtan, Bogor, mulai bulan April sampai Desember 2012, dilanjutkan Oktober 2014 sampai Februari 2016. Tiga jenis sitokinin pada media induksi kalus primer, yaitu kinetin (0,58; 1,16; dan 2,32 μM), thidiazuron (0,01; 0,02; dan 0,04 μM) dan benzylaminopurin (0,55; 1,11; dan 2,22 μM) dikombinasikan dengan 2,4-D 9 μM diuji efektivitasnya dalam menginduksi embriogenesis somatik dari eksplan mahkota bunga dan staminoid kakao aksesori Cimanggu 1. Selanjutnya, tiga taraf kinetin (0,58; 1,16; dan 2,32 μM) juga dikombinasikan dengan 2,4-D 9 μM diuji pengaruhnya terhadap pembentukan embrio somatik dari eksplan mahkota bunga dan staminoid 3 genotipe kakao (Sulawesi 02, ICCRI 04, dan Cimanggu 3). Hasil penelitian menunjukkan kinetin 2,32 μM dan penggunaan eksplan staminoid lebih efektif untuk menginduksi embriogenesis somatik kakao aksesori Cimanggu 1 (7% dengan 0,23 embrio/eksplan). Terdapat interaksi antara taraf kinetin dengan jenis eksplan dan genotipe terhadap persentase eksplan membentuk embrio umur 12 minggu setelah kultur. Persentase pembentukan embrio somatik yang paling tinggi ditunjukkan oleh klon ICCRI 04 dengan penggunaan eksplan mahkota bunga dan taraf kinetin 1,16 μM (31,85%), namun tidak berbeda nyata dengan taraf kinetin 2,23 μM (25,55%). Pembentukan embrio somatik primer kakao ditentukan oleh jenis dan taraf sitokinin, jenis eksplan, serta genotipe.

Kata kunci: *Theobroma cacao* L., sitokinin, genotipe, embrio somatik, jenis eksplan

ABSTRACT

Information on the effect of cytokinins on cacao (*Theobroma cacao* L.) primary somatic embryogenesis and its interaction with explant types and genotypes is not yet known. This study aimed to evaluate the effect of cytokinins and its interaction with explant types and genotypes on cacao somatic embryogenesis. The study was conducted at tissue culture laboratory of IAARD, Bogor from April until December 2012 and October 2014 until February 2016. Three types of cytokinins i.e. kinetin (0.58, 1.16, and 2.32 μM), thidiazuron (0.01, 0.02, and 0.04 μM) and benzylaminopurine (0.55, 1.11, and 2.22 μM) in combination with 9 μM 2,4-D were tested for their effectiveness in inducing somatic embryogenesis from petals and staminoid explants of Cimanggu 1 genotype. Furthermore, three levels of kinetin (0.58, 1.16, and 2.32 μM) also in combination with 9 μM 2,4-D were evaluated for their influences on the somatic embryogenesis from petals and staminoid explants of three cacao genotypes i.e. Sulawesi 02, ICCRI 04 and Cimanggu 3. The result demonstrated that 2.32 μM kinetin and staminoids explant were more effective to induce cacao somatic embryogenesis of Cimanggu 1 genotype (7%, 0.23 embryos/explant). Additionally, there were interaction effects between the level of kinetin with explant types and genotype on the percentage of explants forming embryo at 12 weeks after culture. The highest percentage of somatic embryo formation was shown by ICCRI 04 genotype with the use of petals explant and a kinetin level of 1.16 μM (31.85%), but not significantly different from the level of kinetin 2.23 μM (25.55%). The formation of primary somatic embryos of cacao is largely determined by the type and level of cytokinins, type of explant, and genotype.

Keywords: *Theobroma cacao* L., cytokinins, genotypes, somatic embryos, explants types

PENDAHULUAN

Perakitan varietas unggul kakao (*Theobroma cacao* L.) secara konvensional memerlukan waktu yang lama karena siklus hidupnya yang panjang dan latar belakang genetik yang sempit (Brown *et al.*, 2007). Pemanfaatan bioteknologi diharapkan dapat membantu mempercepat pencapaian program pemuliaan kakao, di antaranya melalui pemanfaatan teknologi kultur jaringan (Ajjiah, Rubiyo, & Sudarsono, 2014; Ajjiah, Hartati, Rubiyo, Sukma, & Sudarsono, 2016). Teknologi kultur jaringan dapat dimanfaatkan baik untuk tujuan penyediaan benih klon unggul maupun perbaikan sifat melalui *in vitro* mutagenesis dan seleksi *in vitro*. Teknologi kultur jaringan juga diperlukan di dalam transformasi genetik untuk meregenerasikan sel tanaman yang telah ditransformasi. Oleh karena itu, tersedianya metode regenerasi kakao yang efisien melalui kultur jaringan sangat diperlukan (Ajjiah *et al.*, 2016), salah satunya melalui embriogenesis somatik.

Metode regenerasi kakao melalui embriogenesis somatik telah dikembangkan melalui pembentukan embrio somatik primer dan sekunder. Embrio somatik primer adalah embrio somatik yang diinduksi dari jaringan tanaman induk sebagai eksplan, sedangkan embrio somatik sekunder pembentukannya diinduksi dari embrio somatik primer. Beberapa faktor diketahui berpengaruh terhadap embriogenesis somatik primer kakao, di antaranya adalah jenis eksplan, genotipe, dan komposisi zat pengatur tumbuh (ZPT) (Avivi, Hardjosoedarmo, & Hartanto, 2012; Ajjiah *et al.*, 2014; Ajjiah *et al.*, 2016). Beberapa jenis sitokinin telah digunakan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik primer pada kakao dengan tingkat keberhasilan bervariasi. Avivi *et al.* (2012) berhasil menginduksi embriogenesis somatik primer pada beberapa klon kakao menggunakan adenin. Sementara Ajjiah *et al.* (2014) melaporkan penggunaan thidiazuron (TDZ) mampu menginduksi pembentukan embrio somatik primer kakao klon Sca 6, namun sebaliknya untuk klon TSH 858 dan ICS 13. Selanjutnya, Ajjiah *et al.* (2016) juga telah berhasil menginduksi pembentukan embrio somatik primer sembilan genotipe kakao menggunakan kinetin 2,32 μM yang dikombinasikan dengan 2,4-D 9 μM dengan tingkat keberhasilan bervariasi bergantung pada genotipe dan jenis eksplan.

Belum diketahui apakah jenis sitokinin berpengaruh terhadap pembentukan embrio somatik primer kakao, dan apakah terdapat interaksi antara taraf sitokinin dengan genotipe dan jenis eksplan terhadap

pembentukan embrio somatik primer kakao. Oleh karena itu, penelitian bertujuan mengevaluasi pengaruh sitokinin serta interaksinya dengan genotipe dan jenis eksplan terhadap pembentukan embrio somatik primer kakao.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Balitbangtan), Bogor, mulai bulan April sampai Desember 2012, dilanjutkan bulan Oktober 2014 sampai Februari 2016.

Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bunga kakao aksesori Cimanggu 1 dan Cimanggu 3 yang masih kuncup berumur sekitar 3 minggu (Gambar 1), serta klon Sulawesi 02 dan ICCRI 04 yang merupakan koleksi Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Balitbangtan. Kuncup bunga disterilisasi di dalam *laminar air flow* menggunakan klorox 5% selama 10 menit, kemudian dibilas akuades steril 3 kali. Mahkota bunga dan staminoid dipisahkan dari kuncup bunga di dalam cawan petri steril menggunakan pisau (*scalpel*) dan pinset berujung runcing yang steril.

Induksi Embriogenesis Somatik

Induksi embriogenesis somatik primer dilakukan menggunakan metode Li, Traore, Maximova, & Guiltinan (1998) yang dimodifikasi. Kalus diinduksi dari eksplan mahkota bunga dan staminoid pada media induksi kalus primer (*primary callus induction*) selama 14 hari, kemudian disubkultur pada media induksi kalus sekunder (*secondary callus growth*) selama 14 hari. Media induksi kalus primer terdiri dari media dasar Driver dan Kuniyuki (DKW) dengan penambahan *dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) 9 μM dan beberapa jenis sitokinin (bergantung perlakuan), sedangkan media induksi kalus sekunder terdiri dari media dasar *woody plant media* (WPM) dengan penambahan 2,4-D 9 μM dan kinetin 1,16 μM (Ajjiah *et al.*, 2016). Kalus embriogenik yang telah terbentuk dipindahkan pada media DKW tanpa ZPT dan disubkultur setiap dua minggu ke dalam media yang sama sampai terbentuk embrio somatik fase globular, hati, torpedo, dan kotiledon dewasa.

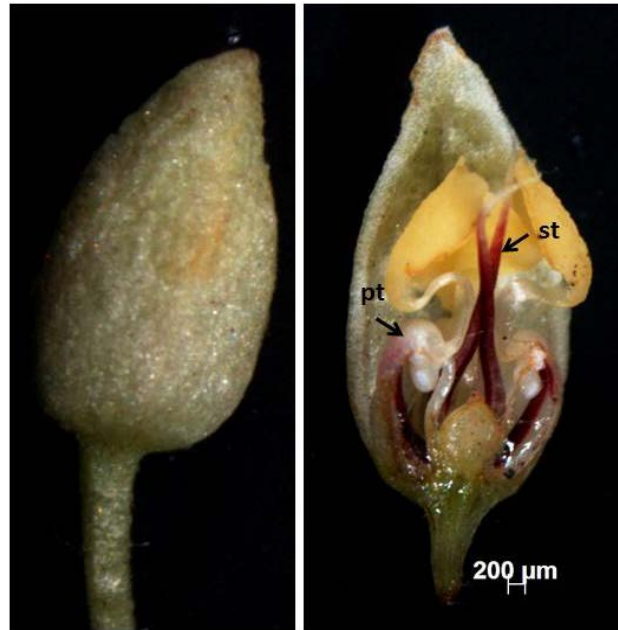


Foto: Nur Ajijah

Gambar 1. Kuncup bunga kakao dan bagian-bagiannya yang digunakan sebagai eksplan, st = staminoid, pt = mahkota bunga

Figure 1. Flower bud of cacao and their parts used as explants, st = staminoid, pt = petal

Uji Jenis dan Taraf Sitokinin pada Dua Jenis Eksplan

Jenis dan taraf sitokinin yang diuji adalah TDZ dengan taraf konsentrasi 0,01; 0,02; dan 0,04 μM ; benzylaminopurine (BAP) dengan taraf konsentrasi 0,55; 1,11; dan 2,22 μM ; serta kinetin dengan taraf konsentrasi 0,58; 1,16; dan 2,32 μM ; yang masing-masing dikombinasikan dengan 2,4-D 9 μM . Seluruh jenis dan taraf sitokinin tersebut digunakan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik dari eksplan mahkota bunga dan staminoid aksesori Cimanggu 1 sehingga diperoleh 18 kombinasi perlakuan. Penelitian disusun dalam rancangan lingkungan acak lengkap dengan lima ulangan. Setiap unit percobaan terdiri dari 10 eksplan. Pengamatan dilakukan terhadap persentase eksplan membentuk kalus pada 4 minggu setelah kultur (MSK), serta persentase eksplan membentuk embrio somatik dan jumlah embrio somatik fase globuler, hati, torpedo, dan kotiledon per eksplan pada 12 MSK.

Uji Interaksi Taraf Sitokinin dengan Genotipe dan Jenis Eksplan

Tiga taraf kinetin, yaitu 0,58; 1,16; dan 2,32 μM , dikombinasikan dengan 2,4-D 9 μM digunakan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik dari eksplan mahkota bunga dan staminoid klon Sulawesi 02, ICCRI 04, dan aksesori Cimanggu 3. Perlakuan disusun dalam rancangan faktorial 3 faktor (taraf kinetin, jenis

genotipe, dan jenis eksplan seperti yang telah disebutkan di atas) dengan lima ulangan, dan setiap unit percobaan terdiri dari 10 eksplan. Pengamatan dilakukan terhadap persentase eksplan membentuk embrio somatik dan jumlah embrio somatik fase globuler, hati, torpedo, dan kotiledon per eksplan pada 12 MSK.

Perkecambahan Embrio Somatik dan Pembesaran Planlet

Embrio somatik fase kotiledon dewasa dikecambahkan pada media tanpa ZPT sampai terbentuk daun normal. Pembesaran planlet juga dilakukan pada media tanpa ZPT (Ajijah *et al.*, 2016).

Pengamatan Mikroskop

Pengamatan mikroskopik dilakukan menggunakan mikroskop *AxioVision* (Zeiss) yang dilengkapi dengan kamera *AxioCam* (Zeiss). Kamera dihubungkan dengan komputer yang dilengkapi dengan perangkat lunak *AxioVision Release 4.8.2*.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis ragam dan dilanjutkan uji Duncan pada taraf 5% dengan menggunakan program *SPSS Statistics 20*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Jenis dan Taraf Sitokinin serta Jenis Eksplan terhadap Pembentukan Kalus dan Embrio Somatik

Pembentukan kalus merupakan tahapan paling menentukan di dalam proses embriogenesis somatik tidak langsung. Hanya kalus yang bersifat embriogenik yang dapat membentuk embrio somatik. Pada penelitian ini, kalus terbentuk pada semua jenis dan taraf sitokinin

yang diuji, baik dari eksplan mahkota bunga maupun staminoid. Rata-rata persentase pembentukan kalus paling tinggi (90%) diperoleh dari eksplan staminoid dengan perlakuan TDZ 0,04 μM , sedangkan terendah (5%) dari eksplan staminoid dengan perlakuan kinetin 0,58 μM (Tabel 1). Struktur kalus yang terbentuk adalah nodular dengan permukaan yang licin dan mengkilat. Struktur kalus seperti ini diperoleh pada media yang mendapat penambahan kinetin, TDZ, maupun BAP (Gambar 2).

Tabel 1. Pengaruh jenis dan taraf sitokinin serta jenis eksplan terhadap pembentukan kalus dan embrio somatik kakao aksesori Cimanggu 1

Table 1. The effect of the type and level of cytokinins and explant types on the formation of callus and somatic embryos of Cimanggu 1 accession

Eksplan	Jenis sitokinin	Konsentrasi (μM)	Eksplan berkalus (%)	Eksplan membentuk embrio somatik* (%)	Jumlah embrio somatik*/ eksplan
Mahkota bunga	TDZ	0,01	25,0 abc	0,0	0,0
		0,02	25,0 abc	0,0	0,0
		0,04	30,0 abc	0,0	0,0
	Kinetin	0,58	35,0 abc	0,0	0,0
		1,16	15,0 abc	0,0	0,0
		2,32	20,0 abc	0,0	0,0
	BAP	0,55	10,0 ab	0,0	0,0
		1,11	21,1 abc	0,0	0,0
		2,22	50,0 cd	0,0	0,0
Staminoid	TDZ	0,01	35,0 abc	0,0	0,0
		0,02	80,0 de	0,0	0,0
		0,04	90,0 e	0,0	0,0
	Kinetin	0,58	5,0 a	0,0	0,0
		1,16	39,4 abc	0,0	0,0
		2,32	50,0 cd	7,0	0,2
	BAP	0,55	45,0 bc	0,0	0,0
		1,11	15,0 abc	0,0	0,0
		2,22	25,0 abc	0,0	0,0

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%; * = meliputi embrio somatik fase globular, hati, torpedo, dan kotiledon

Notes : Numbers followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's test at 5% levels; * = including globular, heart, torpedo, and cotyledonary phases of somatic embryos



Foto: Nur Ajijah

Gambar 2. Kalus kakao aksesori Cimanggu 1 pada media induksi kalus primer dengan penambahan: (A) kinetin, (B) TDZ, dan (C) BAP. Tanda panah menunjukkan kalus nodular

Figure 2. Cacao callus of Cimanggu 1 accession on primary callus induction medium supplemented with: (A) kinetin, (B) TDZ, and (C) BAP. The arrows indicates nodular callus

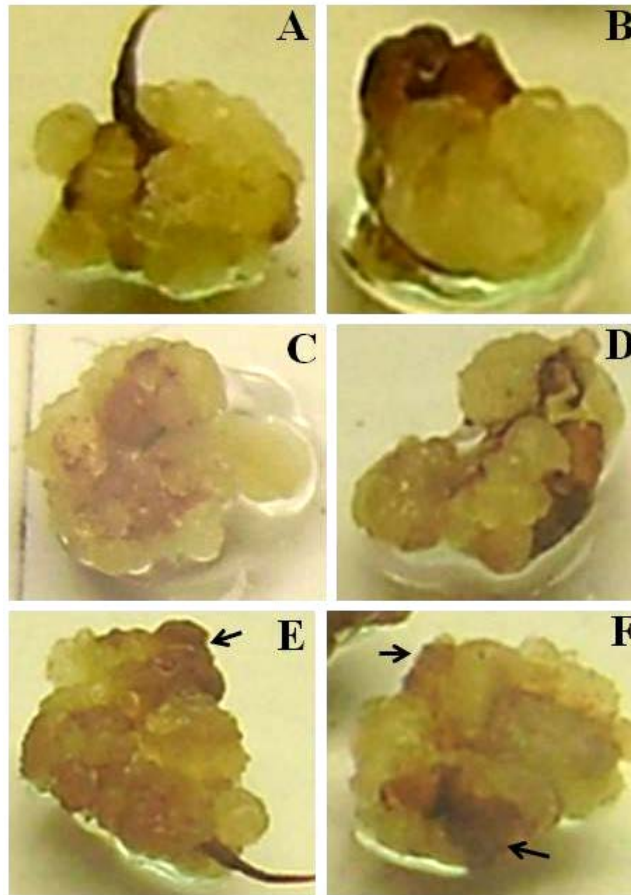


Foto: Nur Ajijah

Gambar 3. Kalus kakao aksesori Cimanggu 1 pada media pertumbuhan kalus sekunder yang diinduksi menggunakan: (A, B) BAP, (C, D) TDZ, (E, F) kinetin. Tanda panah menunjukkan kalus yang mengalami pencokelatan

Figure 3. *Cacao callus of Cimanggu 1 accession on secondary callus growth medium induced using: (A, B) BAP, (C, D) TDZ, (E, F) kinetin. The arrows indicates browning callus*

Setelah disubkultur pada media pertumbuhan kalus sekunder yang mengandung 2,4-D dan kinetin, kalus semakin berkembang (Gambar 3), namun kalus yang berasal dari media induksi kalus primer dengan penambahan kinetin mulai mengalami pencokelatan (Gambar 3E-F). Setelah disubkultur pada media tanpa ZPT, seluruh kalus, baik yang diinduksi menggunakan kinetin, BAP, maupun TDZ, mengalami pencokelatan. Setelah tiga kali subkultur pada media tanpa ZPT, kalus yang diinduksi menggunakan kinetin 2,32 μ M mulai membentuk embrio somatik fase globuler, oblong, dan kotiledon (Gambar 4A dan 4B), sedangkan kalus yang diinduksi menggunakan jenis sitokinin dan taraf kinetin lainnya tidak membentuk embrio.

Auksin dan sitokinin merupakan jenis ZPT yang paling banyak diteliti dan digunakan untuk menginduksi kalus dan regenerasi tanaman (Ikeuchi, Sugimoto, & Iwase, 2013). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan kalus kakao dapat terbentuk pada media yang mengandung hanya auksin, namun embrio somatik hanya terbentuk pada media yang mengandung auksin

dan sitokinin (Ajijah *et al.*, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa sitokinin berperan penting di dalam proses embriogenesis somatik kakao. Menurut Kepczynska & Kepczynski (2012), bersama dengan auksin, sitokinin mempunyai peran yang penting di dalam embriogenesis somatik tanaman. Pada umumnya, sitokinin diperlukan pada fase awal embriogenesis somatik, yaitu mendorong pembelahan sel dan proliferasi kalus serta pembentukan embrio somatik pada fase globular (Nawrot-Chorabik, 2011). Sampai saat ini, lebih dari 200 sitokinin atau ZPT yang memiliki aktivitas seperti sitokinin telah teridentifikasi (Vondráková, Krajňáková, Fischerová, Vágner, & Eliášová, 2016), namun yang umum digunakan di dalam media kultur jaringan di antaranya BAP (6-benzylaminopurine), 2iP (6-dimethylaminopurine), kinetin (N-2-furanylmethyl-1H-purine-6-amine), zeatin (6-4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylamino-purine), dan TDZ (thiazuron-N-phenyl-N-1,2,3 thiadiazol-5ylurea) (Saad & Elshahed, 2012).

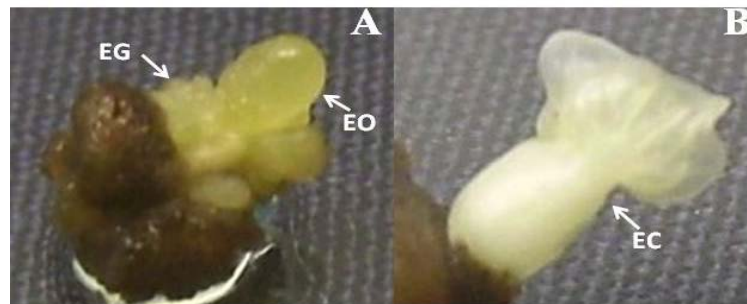


Foto: Nur Ajjiah

Gambar 4. Pembentukan embrio somatik kakao aksesori Cimanggu 1 yang diinduksi dari eksplan staminoid menggunakan kinetin 2,32 μM dikombinasikan dengan 2,4-D 9 μM pada fase: (A) globular dan oblong, serta (B) kotiledon. EC=embrio somatik fase kotiledon, EG = embrio somatik fase globuler, EO= embrio somatik fase oblong

Figure 4. Somatic embryo formation of accession Cimanggu 1 induced from staminoid explant using 2.32 μM kinetin in combination with 9 μM 2.4-D at (A) globular and oblong phase, and (B) cotyledonary phase. EC= cotyledonary embryo, EG=globular embryo, EO=oblong embryo

Penggunaan TDZ dilaporkan efektif untuk menginduksi embriogenesis somatik pada kakao dengan rentang genotipe yang luas (Li *et al.*, 1998), namun pada penelitian ini terjadi hal yang sebaliknya. Embrio somatik kakao aksesori Cimanggu 1 hanya terbentuk dari kalus yang berasal dari eksplan staminoid yang diinduksi dengan kinetin 2,32 μM . Tidak ada satu pun embrio terbentuk dari kalus yang diinduksi dengan menggunakan TDZ dan BA (Tabel 1).

Respons tanaman terhadap jenis sitokinin sangat berbeda-beda. Menurut Sakakibara (2006) setiap jenis sitokinin mempunyai efektivitas dan aktivitas biologi yang berbeda, dan setiap tanaman mempunyai preferensi terhadap jenis sitokinin tertentu. Priyanka, Upendhar, & Singh (2015) melaporkan bahwa jenis auksin dan sitokinin memberikan pengaruh terhadap pembentukan embrio somatik dari eksplan kotiledon tanaman *Emblica officinalis*, dan dalam hal ini embrio somatik hanya terbentuk pada media yang mengandung 2,4-D dan kinetin. Sementara itu, Wongtiem *et al.* (2011) melaporkan adenin lebih efektif dibandingkan dengan BAP kinetin, zeatin, dan 2ip dalam menginduksi embriogenesis somatik sekunder pada tanaman *Manihot esculenta*. Malik (2012) juga melaporkan bahwa respons embriogenesis somatik sekunder tanaman *Narcissus sp.* terhadap jenis sitokinin sangat bergantung pada sistem kulturnya (padat atau cair). Adanya perbedaan respons terhadap jenis sitokinin mungkin disebabkan oleh perbedaan reseptor yang dimiliki oleh setiap tanaman atau kelompok genetik tertentu. Setiap reseptor mempunyai kemampuan yang berbeda untuk membentuk ikatan (*ligan*) dengan jenis sitokinin tertentu, seperti yang dilaporkan oleh Lomin, Yonekura-sakakibara, Romanov, & Sakakibara (2011).

Taraf kinetin 2,32 μM memberikan pengaruh yang lebih baik untuk menginduksi embriogenesis somatik pada aksesori Cimanggu 1 maka

pada penelitian tahap selanjutnya dilakukan pengujian untuk mengetahui apakah terdapat interaksi antara taraf kinetin dengan genotipe dan jenis eksplan.

Pengaruh Interaksi Genotipe, Jenis Eksplan, dan Taraf Kinetin terhadap Pembentukan Embrio Somatik

Hasil penelitian menunjukkan terdapat interaksi yang nyata antara genotipe dengan jenis eksplan dan taraf kinetin terhadap persentase eksplan membentuk embrio umur 12 MSK (Tabel 2). Rata-rata persentase eksplan membentuk embrio paling tinggi diperoleh dari eksplan mahkota bunga klon ICCRI 04 dengan taraf kinetin 1,16 μM sebesar 31,85% yang tidak berbeda nyata dengan taraf kinetin 2,32 μM sebesar 25,55%, namun berbeda nyata dengan kombinasi perlakuan lainnya (Tabel 2). Adanya interaksi antara genotipe, jenis eksplan, dan taraf kinetin menunjukkan perbedaan respons setiap genotipe dan jenis eksplan terhadap taraf kinetin.

Pengaruh interaksi antara taraf kinetin, genotipe, dan jenis eksplan tidak nyata terhadap peubah jumlah embrio per eksplan. Peubah jumlah embrio per eksplan diduga kurang sensitif bila dibandingkan dengan peubah persentase eksplan membentuk embrio. Namun demikian, faktor genotipe, jenis eksplan, dan taraf kinetin, masing-masing secara tunggal berpengaruh nyata terhadap jumlah embrio per eksplan. Di antara ketiga taraf kinetin yang diuji, taraf 1,16 μM menghasilkan jumlah embrio somatik per eksplan lebih tinggi dibandingkan dengan taraf kinetin lainnya. Selanjutnya, klon ICCRI 04 menunjukkan respons pembentukan embrio somatik lebih tinggi dibandingkan dengan klon Sulawesi 02 dan aksesori Cimanggu 3, sementara itu eksplan mahkota bunga lebih responsif dibandingkan staminoid (Gambar 5).

Tabel 2. Pengaruh interaksi genotipe, taraf kinetin, dan jenis eksplan terhadap persentase eksplan membentuk embrio umur 12 minggu setelah kultur

Table 2. Interaction effect between genotypes, kinetin levels, and explant types on percentage of explants forming embryo at 12 weeks after culture

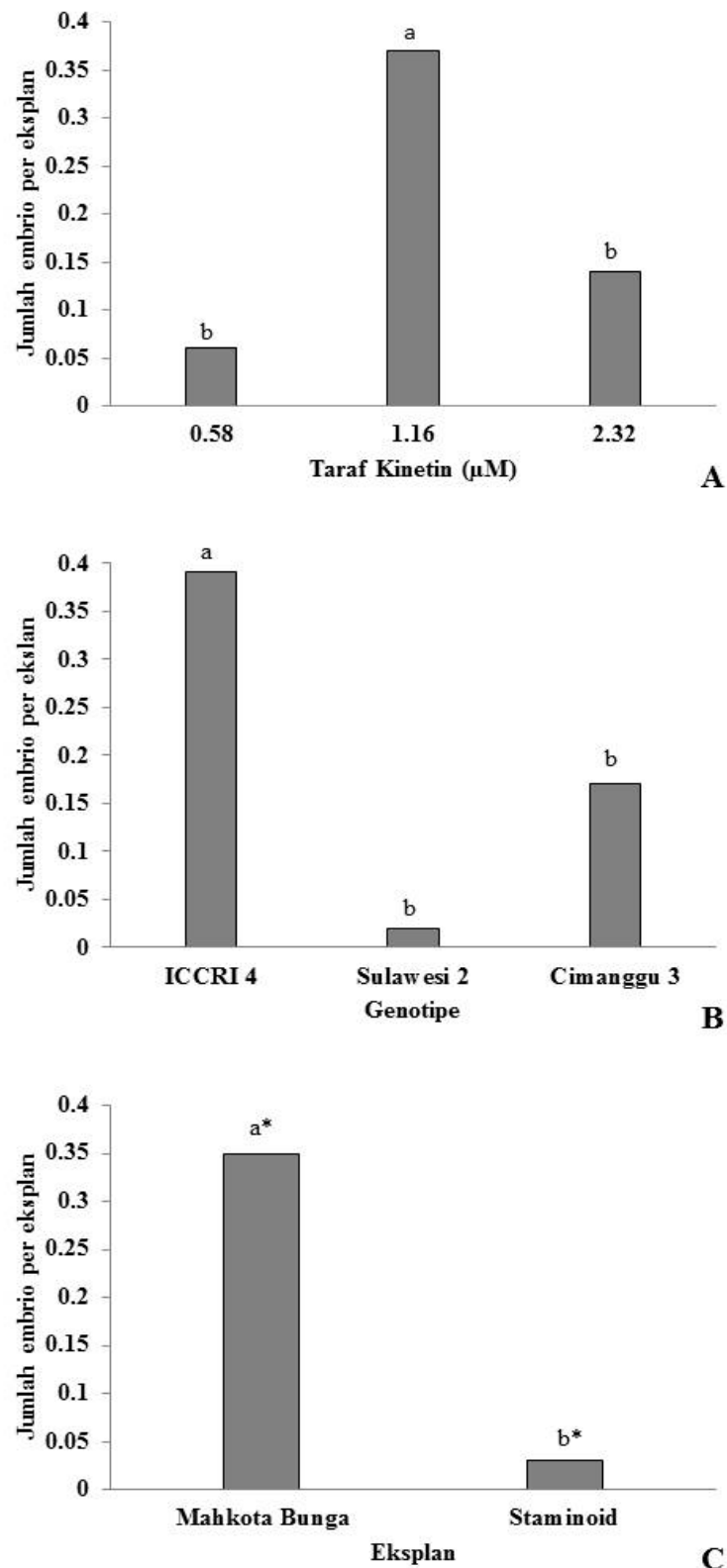
Genotipe	Jenis eksplan	Taraf kinetin (μM) dikombinasikan dengan 2,4-D 9 μM	Eksplan membentuk embrio somatik (%)
ICCRI 04	Mahkota Bunga	0,58	6,25 a
		1,16	31,85 b
		2,32	25,55 b
	Staminoid	0,58	0,00 a
		1,16	6,67 a
		2,32	0,00 a
Sulawesi 02	Mahkota Bunga	0,58	5,56 a
		1,16	0,00 a
		2,32	0,00 a
	Staminoid	0,58	0,00 a
		1,16	0,00 a
		2,32	0,00 a
Cimanggu 3	Mahkota Bunga	0,58	4,00 a
		1,16	10,44 a
		2,32	10,44 a
	Staminoid	0,58	0,00 a
		1,16	2,00 a
		2,32	2,00 a

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%; * = meliputi embrio somatik fase globular, hati, torpedo, dan kotiledon

Notes : Numbers followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's test at 5% levels; * = including globular, heart, torpedo, and cotyledonary phases of somatic embryos

Embriogenesis somatik merupakan proses yang sangat dipengaruhi oleh faktor genetik. Perbedaan respons embriogenesis somatik di antara genotipe banyak ditemukan pada berbagai jenis tanaman budi daya, di antaranya *Vitis vinifera* L. (Malabadi, Vijaykumar, Nataraja, & Mulgund, 2010), *Vitis* spp. (Li *et al.*, 2014), *Gossypium* spp. (Ghaemi, Majid, Fallahian, & Bezdi, 2011), *Ipomea batatas* L. (Sefasi *et al.*, 2012) dan *Manihot esculenta* Crantz (Ngugi *et al.*, 2015; Mongomake, DOUNGOU, Khatabi, & Fondong, 2015). Perbedaan respons embriogenesis somatik di antara genotipe kakao juga telah dilaporkan sebelumnya oleh Avivi *et al.* (2010); Ajijah *et al.* (2014); dan Ajijah *et al.* (2016).

Pada umumnya, kelompok genetik kakao Forastero lebih responsif (embriogenik) dibandingkan dengan Criollo, dan kelompok genetik Trinitario berada di antara Forastero dan Criollo. Rendahnya persentase pembentukan embrio somatik pada aksesori Cimanggu 1 dan klon Sulawesi 02 diduga keduanya bukan merupakan genotipe kakao yang respons terhadap proses embriogenesis somatik, atau dengan kata lain keduanya memiliki kemampuan membentuk embrio somatik yang rendah. Belum diketahui dengan pasti kelompok genetik dari aksesori Cimanggu 1 dan klon Sulawesi 02, tetapi diduga termasuk ke dalam kelompok genetik Trinitario.



Gambar 5. Pengaruh taraf kinetin, genotipe, dan jenis eksplan terhadap rata-rata jumlah embrio per eksplan umur 12 minggu setelah kultur. Huruf yang sama pada masing-masing faktor tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%. * berbeda nyata berdasarkan uji t pada taraf 5%

Figure 5. Effect of kinetin levels, genotypes, and explant types on average number of embryos per explant at 12 weeks after culture. Same letters for each factor were not significantly different according to Duncan's test at 5% levels. * significantly different based on t-test at 5% levels

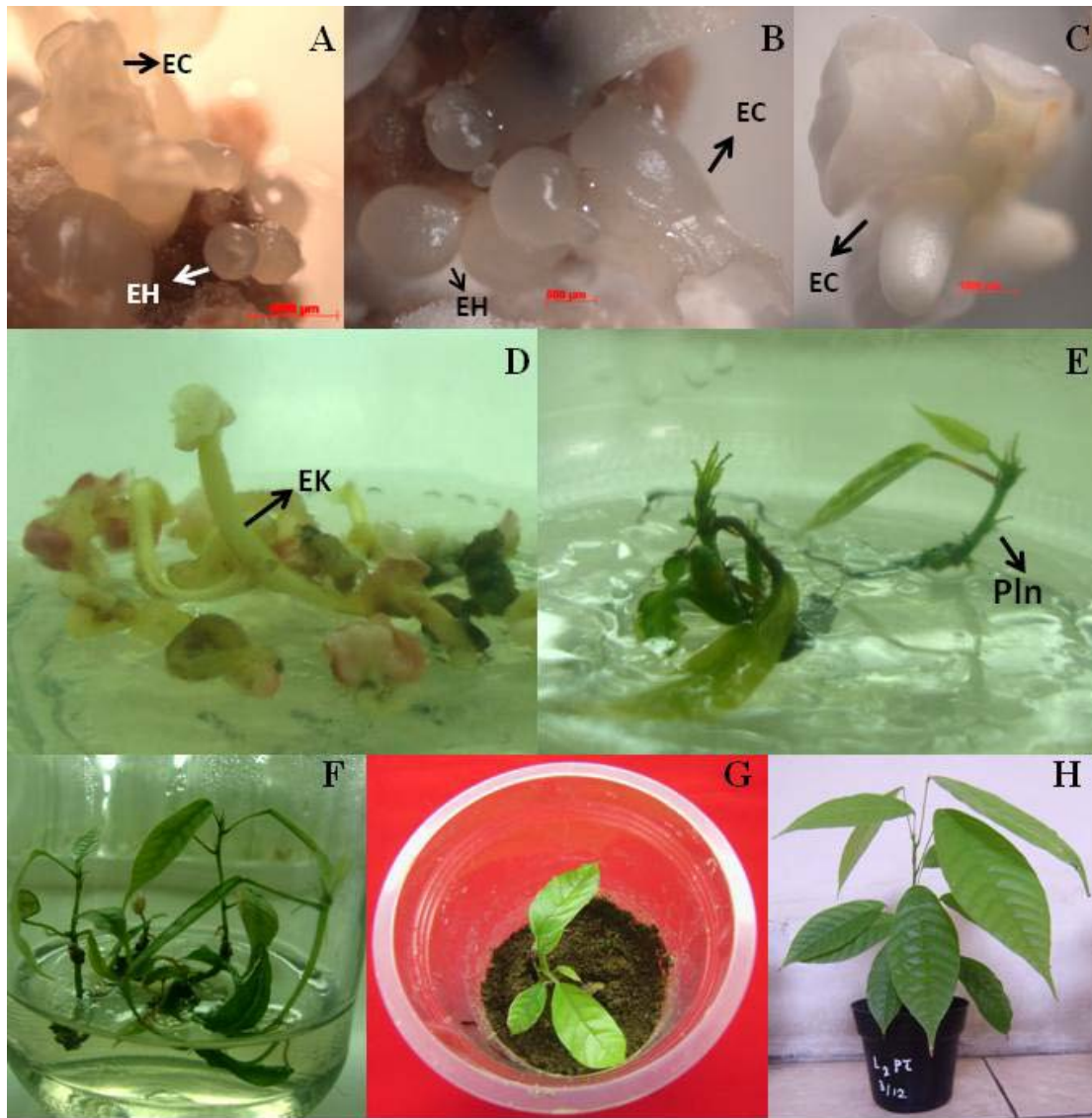


Foto: Nur Ajijah

Gambar 6. Pembentukan embrio somatik dan planlet kakao yang diinduksi menggunakan kinetin. Embrio somatik fase hati dan kotiledon awal (A) aksesii Cimanggu 3, (B) klon ICCRI 04, (C) fase kotiledon dewasa klon Sulawesi 02, (D) perkecambahan embrio somatik dan (E, F) pembentukan planlet klon ICCRI 04, (G) aklimatisasi dan (H) tanaman pasca aklim aksesii Cimanggu 3. EC = embrio somatik fase kotiledon, EH = embrio somatik fase hati, EK = embrio somatik fase kecambah, Pln = planlet

Figure 6. Formation of cacao somatic embryos and plantlets induced by kinetin. Somatic embryos at heart and early cotyledonary stages of (A) Cimanggu 3 accession, (B) ICCRI 04 clone, (C) mature cotyledonary stage of Sulawesi 02 clone, (D) somatic embryo germination and (E, F) plantlets formation of ICCRI 04 clone, (G) acclimatization and (H) somatic embryo-derived plant of Cimanggu 3 accession. EC = cotyledonary somatic embryos, EH = heart somatic embryos, EK = germinating somatic embryos, Pln = plantlet

Adanya perbedaan respons embriogenik di antara jenis eksplan juga telah dilaporkan pada banyak tanaman (Górska-Koplińska, Żróbek-Sokolnik, Górecki, Michalczyk, & Michalczyk, 2010; Zuyasna, Hafsah, Fajri, Syahputra, & Ramadhan, 2012; Nyaboga, Njiru, & Tripathi, 2015). Perbedaan respons embriogenik dari eksplan mahkota bunga dan staminoid pada kakao juga telah dilaporkan sebelumnya oleh Avivi *et al.* (2010); Ajijah *et al.* (2014); dan Ajijah *et al.*

(2016). Perbedaan respons di antara organ bunga juga dilaporkan terjadi pada tanaman *Feijoa sellowiana* (Stefanello, Vesco, Ducroquet, Nodari, & Guerra, 2005). Adanya perbedaan respons ini diduga disebabkan perbedaan kandungan hormon endogen pada masing-masing jenis eksplan. Kandungan hormon endogen merupakan faktor utama yang menentukan respons sel dan merupakan faktor penting yang mempengaruhi

potensi embriogenik dari masing-masing jenis eksplan (Jimenez, 2001).

Gambar 6 memperlihatkan berbagai tahap perkembangan embrio somatik klon Cimanggu 3, ICCRI 04, dan Sulawesi 02, perkecambahan embrio somatik dan pembentukan planlet klon ICCRI 04, serta aklimatisasi planlet dan tanaman pasca aklim asal embrio somatik aksesori Cimanggu 3.

KESIMPULAN

Kinetin 2,32 μM dengan eksplan staminoid memberikan hasil yang lebih baik untuk menginduksi pembentukan embrio somatik primer aksesori Cimanggu 1 dengan persentase pembentukan embrio somatik sebesar 7,0% dan jumlah embrio per eksplan 0,23. Terdapat interaksi antara taraf kinetin, genotipe, dan jenis eksplan terhadap peubah persentase pembentukan embrio somatik, tetapi sebaliknya untuk peubah jumlah embrio per eksplan. Kombinasi perlakuan terbaik untuk menginduksi pembentukan embrio somatik primer kakao adalah klon ICCRI 04 dengan eksplan mahkota bunga dan taraf kinetin 1,16 μM sebesar 31,85%, dan tidak berbeda dengan kombinasi klon ICCRI 04 dengan eksplan mahkota bunga dan taraf kinetin 2,32 μM sebesar 25,55%. Sementara itu, klon ICCRI 04, eksplan mahkota bunga, dan taraf kinetin 1,16 μM masing-masing merupakan taraf faktor perlakuan terbaik dalam menghasilkan jumlah embrio per eksplan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan, Balitbangtan yang telah mendanai penelitian ini melalui DIPA No. 081-09.2.237291/2012-2016. Terima kasih juga disampaikan kepada R. Siti Masithoh dan Cindy Ameliyanti yang telah memberikan bantuan teknis di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajjah, N., Hartati, S., Rubiyono, R., Sukma, D., & Sudarsono, S. (2016). Effective cacao somatic embryo regeneration on kinetin supplemented medium DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 38(1), 80–92. doi: <http://doi.org/10.17503/agrivita.v38i1.619>.
- Ajjah, N., Rubiyono, & Sudarsono. (2014). Pembentukan kalus dan embrio somatik kakao menggunakan thidiazuron melalui satu tahap induksi kalus. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*, 20(4), 179–186.
- Avivi, S., Hardjosoedarmo, S., & Hartanto, S. P. (2012). Perbandingan media Murashige & Skoog dan Penn State Cacao untuk embriogenesis somatik dari eksplan beberapa bagian bunga kakao. *Bionatura-Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati dan Fisik*, 14(1), 68–77.
- Brown, J. S., Phillips-mora, W., Power, E. J., Krol, C., Cervantes-martinez, C., Motamayor, J. C., & Schnell, R. J. (2007). Mapping QTLs for resistance to frosty pod and black pod diseases and horticultural traits in *Theobroma cacao* L., (October), 1851–1858. doi: <http://doi.org/10.2135/cropsci2006.11.0753>.
- Ghaemi, M., Majd, A., Fallahian, F., & Bezdi, K.G. (2011). Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (*Gossypium* spp.) and histology of somatic embryogenesis. *African J Bio.*, 10, 2915–2922.
- Górska-Koplińska, K., Żróbek-Sokolnik, A., Górecki, R. J., Michalczuk, D. J., & Michalczuk, D. J. (2010). The effect of explant type on somatic embryogenesis induction in *Pisum sativum* L. *Polish Journal of Natural Science*, 25(3), 229–235. doi: <http://doi.org/10.2478/v10020-010-0020-z>.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: Mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–73. doi: <http://doi.org/10.1105/tpc.113.116053>.
- Jimenez, V.M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *R Bras Fisiol Veg.*, 13, 196–223.
- Kepczynska, E., & Kepczynski, J. (2012). Phytohormones in *Medicago* spp. somatic embryogenesis. *BioTechnologia Session I. Plant differen.*, 93, 153.
- Li, Z.T., Kim, K.H., Dhekney, S. a, Jasinski, J. R., Creech, M. R., & Gray, D. J. (2014). An optimized procedure for plant recovery from somatic embryos significantly facilitates the genetic improvement of Vitis. *Horticulture Research*, 1(April), 14027. doi: <http://doi.org/10.1038/hortres.2014.27>.
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., & Guiltinan, M. J. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 34, 293–299.
- Lomin, S. N., Yonekura-sakakibara, K., Romanov, G. A., & Sakakibara, H. (2011). Ligand-binding properties and subcellular localization of maize cytokinin receptors. *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 5149–5159. doi: <http://doi.org/10.1093/jxb/err220>.

- Malabadi, R.B., Vijaykumar, S., Nataraja, K., & Mulgund, G.S. (2010). Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration in grapes (*Vitis vinifera* L.). *Bot. Research Inter.*, 3, 48–55.
- Malik, M. (2012). Different kinds of cytokinin effect on *Narcissus* L. “Actaceae” somatik embryo development in solid and liquid/solid culture system. *BioThchnologia*, 93(2), 168.
- Mongomake, K., Doungous, O., Khatabi, B., & Fondong, V. N. (2015). Somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Cameroon. *SpringerPlus*, 4(1), 477. doi: <http://doi.org/10.1186/s40064-015-1272-4>.
- Nawrot-Chorabik, K. (2011). Somatic embryogenesis in forest plants. In *Embryogenesis* (pp. 424–446). Retrieved from http://cdn.intechopen.com/pdfs/35578/intech-somatic_embryogenesis_in_forest_plants.pdf.
- Ngugi, M., Oduor, R. O., Omwoyo, R. O., Njahi, J. M., Mgtutu, A. J., & Cheruiyot, R. C. (2015). Regeneration of Kenyan Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) Genotypes. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 3(2), 147. doi: <http://doi.org/10.4172/2329-9029.1000147>
- Nyaboga, E.N., Njiru, J.M., & Tripathi, L. (2015). Factors influencing somatic embryogenesis, regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar TME14. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–13. doi: <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00411>.
- Priyanka, Upendhar, K., & Singh, K. P. (2015). Indirect, direct and secondary somatic embryogenesis in *Embllica officinalis*. *Global Journal for Research Analysis*, 4(4), 1–4.
- Saad, A. I. M., & Elshahed, A. M. (2012). *Plant tissue culture media. Recent advances in plant in vitro culture*. doi: <http://doi.org/10.1007/BF02796489>.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57(1), 431–449. doi: <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- Sefasi, A., Kreuze, J., Ghislain, M., Manrique, S., Kiggundu, A., & Ssemakula, G. (2012). Induction of somatic embryogenesis in recalcitrant sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars, 11(94), 16055–16064. doi: <http://doi.org/10.5897/AJB12.1615>.
- Stefanello, S., Vesco, L., Ducroquet, J.P., Nodari, R.O., Guerra, M.P. (2005). Somatic embryogenesis from floral tissues of feijoa (*Feijoa sellowiana* Berg.). *Sci Hort.*, 105, 117–126.
- Vondráková, Z., Krajiňáková, J., Fischerová, L., Vágner, M., & Eliášová, K. (2016). *Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis*. In S. P. Park, J. M. Bonga, & H. K. Moon (Eds.), *Vegetatif propagation of forest trees*. Seoul, Korea: National Institute of Forest Science.
- Wongtiem, P., Courtois, D., Florin, B., Juchaux, M., Peltier, D., Broun, P., & Ducos, J. P. (2011). Effects of cytokinins on secondary somatic embryogenesis of selected clone Rayong 9 of *Manihot esculenta* Crantz for ethanol production. *African Journal of Biotechnology*, 10(9), 1600–1608. doi: <http://doi.org/10.5897/AJB10.1820>
- Zuyasna, Hafsah, S., Fajri, R., Syahputra, M.O., & Ramadhan, G. (2012). The effect of picloram concentrations and explants types on the induction of somatic embryo on North Aceh Cocoa genotype. *Proceeding of The 2th Annual International Conference Syih Kuala University & The 8th IMT-GT Uninet Bioscience Conference*, 2, 395–398.

