

PERBANDINGAN MEDIA MURASHIGE & SKOOG DAN PENN STATE CACAO UNTUK EMBRIOGENESIS SOMATIK DARI EKSPLAN BEBERAPA BAGIAN BUNGA KAKAO

Avivi, S¹., Hardjosoedarmo, S¹., dan Hartono, S.P.²

¹Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

²Jurusan Agronomi, Pascasarjana Universitas Jember

E-mail: avi_vi@yahoo.com

ABSTRAK

Daya regenerasi kakao secara *in vitro* sangat dipengaruhi oleh komposisi media, jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh. Penelitian ini mempelajari perbandingan efektivitas media Murashige & Skoog (MS) dan Penn State Cacao (PSC) untuk regenerasi embriogenesis somatik organ bunga kakao. Penelitian disusun menurut rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan empat ulangan. Faktor pertama adalah dua macam media terdiri atas media MS dan media PSC, sedangkan faktor kedua adalah 5 macam bagian organ bunga terdiri dari petala, staminodia, anthera, dasar bunga, dan putik. Bahan tanaman yang digunakan adalah klon DR1. Tahap penelitian ini terdiri dari tahap inisiasi, induksi, multiplikasi dan perakaran. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Media PSC memberikan respon lebih baik dibandingkan media MS pada tahap inisiasi dan induksi. Dari lima organ bunga yang dikulturkan, hanya petala, staminodia dan anthera yang mudah berkalus. Inisiasi kalus terbaik terjadi pada media PSC yang ditunjukkan oleh parameter persentase eksplan berkalus. Respon persentase kalus yang terbentuk pada 12 hari setelah tanam (HST) tertinggi terjadi pada eksplan petala (100%), diikuti staminodia (98,5%) dan anthera (22,3%). Pada tahap induksi, media PSC juga menjadi media yang lebih baik dari media MS. Persentase eksplan menghasilkan embrio pada tahap induksi (10 minggu setelah tanam/MST) tertinggi dihasilkan oleh petala (12,0%) diikuti oleh staminodia (4,0 %) dan anthera (2,8 %).

Kata kunci: bibit kakao, embriogenesis somatik, organ bunga

COMPARISON OF MURASHIGE & SKOOG AND PENN STATE CACAO AS SOMATIC EMBRYOGENESIS MEDIA USING CACAO FLOWER EXPLANT

ABSTRACT

The regeneration of cocoa flower through *in vitro* was influenced by the media's composition, explant and growth regulator. This research compared two somatic embryogenesis media using cocoa flower as explant. This research was arranged in completely factorial randomized design within four replications. The first factor was two kinds of media that consisted of Murashige & Skoog (MS) and Penn State Cacao (PSC) media; the second factor was 5 kinds of flower organs that consisted of petal, staminode, anther, flower base and ovary. The growing material used was DR1 clone. The stages of this research was initiation, induction, multiplication and rooting. The result showed that among the five flower organs, only petal, staminode, and anther easily produced callus. The best callus initiation showed on PSC media. Petal explant had the highest response callus formation on the 12th days (100%) and was followed by staminode (98.5%) and anther (22.3%). On induction stage, PSC media also became the best media compared with MS media. The percentage of explant producing embryos on the 10th week with petal that had the best response (12.0%) and was followed by staminode (4.0%) and anther (2.8 %).

Key words: cacao seedling, somatic embryogenesis, flower organ

PENDAHULUAN

Bahan tanaman merupakan salah satu kunci utama untuk mencapai keberhasilan di bidang perkebunan tanaman kakao. Ketersediaan bahan tanaman unggul baru diharapkan dapat meningkatkan produksi dan mutu hasil kakao. Kebutuhan benih kakao total dalam rangka program revitalisasi perkebunan kakao Nasional pada tahun 2010 diprediksikan sebanyak 80,1 juta butir (Rahardjo dan Wahyudi, 2006). Oleh karena itu sangat penting menyediakan bibit kakao dalam jumlah banyak dan bermutu tinggi untuk memenuhi kebutuhan tersebut.

Perbanyakan tanaman kakao sampai saat ini paling banyak dilakukan secara generatif (75-90%) melalui benih hibrida F1 dan dalam proporsi yang lebih sedikit (10-25%) dilakukan secara vegetatif melalui setek, sambungan dan okulasi (entres) (Winarsih, *dkk.* 2003). Perbanyakan secara generatif melalui benih F1 hasil persilangan banyak tetua, relatif lebih mudah tetapi tanaman yang dihasilkan mempunyai sifat yang tidak seragam dan heterogenitasnya tinggi (Maximova, *et al.*, 2002). Perbanyakan secara vegetatif lebih sulit dibandingkan dengan perbanyakan secara generatif, namun tanaman yang dihasilkan seragam (Mark and Maximova, 2000). Walaupun demikian perbanyakan vegetatif ini tidak dapat memenuhi permintaan akan bibit kakao dalam jumlah besar, karena sangat dibatasi oleh jumlah tunas dan cabang yang siap distek, disambung, dan diokulasi.

Teknik kultur jaringan dapat digunakan untuk menghasilkan bibit dan planlet mikro dalam jumlah banyak, seragam, *true of tipe*, dalam waktu yang relatif singkat, dan tidak tergantung musim (Ragapadmi, 2002). Karena itu sangat perlu dicari bibit kakao yang menghasilkan tanaman yang sama baiknya dengan induk unggulnya. Salah satu alternatif adalah dengan memanfaatkan bibit asal organ vegetatif dari organ bunga yang dihasilkan melalui teknik kultur jaringan dengan proses somatik embriogenesis. Organ bunga dipilih karena jaringan tersebut memproduksi fenol dan lendir yang relatif sedikit.

Bibit kakao hasil embriogenesis somatik mempunyai homogenitas yang antar individu yang tinggi, seperti pada kakao hasil perbanyakan vegetatif yang lain. Hasil pengamatan di lapangan menunjukkan ada kecenderungan bibit kakao asal embriogenesis somatik memiliki pertumbuhan dan habitus tanaman yang lebih vigor dan daya hasil yang lebih baik. Karakter ini dapat disebabkan oleh sistem perakaran yang lebih baik dibanding bahan tanam lain (Puslitkoka, 2006).

Faktor yang tidak kalah pentingnya dalam embriogenesis somatik adalah faktor media. Embriogenesis somatik dan regenerasi tanaman pada kultur *in vitro* organ bunga kakao (*Theobroma cacao* L.) telah dilaksanakan menggunakan media dasar MS (Murashige & Skoog, 1962) dengan bahan tanam klon Sca 6, TSH 858, RCC 72, ICS 60 dan DR 2 (Winarsih *et al.*, 2003), tetapi hasilnya kurang memuaskan. Saat ini telah dikembangkan alternatif media untuk embriogenesis somatik pada organ bunga kakao, yaitu media PSC (Penn State Cacao, 2003).

Perbedaan media MS dan PSC adalah sebagai berikut (Tabel 1): tahapan regenerasi pada media MS adalah tahap inisiasi, induksi, multiplikasi dan pendewasaan. Pada tahap inisiasi, digunakan media dasar MS dengan penambahan 2,4-D dan adenin sesuai dengan perlakuan, sukrosa 30 g/l dan phytigel 2 g/l (Lopez-Baez *et al.*, 1993). Sedangkan pada tahap induksi dan pendewasaan menggunakan media dasar MS tanpa penambahan ZPT. Pada tahap multiplikasi, digunakan media dasar MS dengan penambahan NAA 0,01 mg/l; 2 iP 0,3 mg/l; *charcoal* 1 g/l; glukosa 40 g/l dan pematat *phytagel* 3 g/l (Tahardi & Mardiana, 1995). Pada tahap pendewasaan, digunakan media dasar MS dengan penambahan glukosa 10 g/l, *charcoal* 0,3 g/l yang dipadatkan dengan *phytagel* 2 g/l (Alemanno *et al.*, 1996). Sedangkan media PSC (*Penn State Cacao*) menggunakan media dasar DKW (*Driver & Kuniyuki, 1984 DKW*) (Edwin *et al.*, 1987) dengan beberapa penambahan ZPT pada tahap tertentu. Tahap inisiasi kalus menggunakan dua formulasi media.

Formulasi pertama adalah media *PCG* (*Primary Callus Growth*), menggunakan media dasar *DKW* dengan penambahan 2,4-D dan thidiazuron. Formulasi kedua adalah media *SCG* (*Secondary Callus Growth*), tanpa media dasar *DKW*, menggunakan McCown's salts dengan penambahan 2,4-D, kinetin dan air kelapa. Tahap induksi menggunakan formulasi media *ED* (*Embryo Development*), dengan media dasar *DKW* tanpa penambahan ZPT. Tahap multiplikasi menggunakan dua formulasi media. Formulasi pertama adalah media *PEC* (*Primary Embryo Conversion*), menggunakan media dasar *DKW* dengan penambahan asam amino. Formulasi kedua adalah media *SEC* (*Secondary Embryo Conversion*), menggunakan media dasar *DKW* dengan penambahan KNO_3 (Penn State Cacao Research Lab., 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) Membandingkan dua metode regenerasi tanaman kakao menggunakan media yang berbeda sehingga dihasilkan embrio somatik melalui jalur somatik embriogenesis (SE); (2) Mengetahui respons terbaik dari bagian organ bunga kakao terhadap kemampuan embriogenesis somatik.

BAHAN DAN METODE

Percobaan ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember dimulai dari bulan Mei 2008 hingga bulan Juni 2009.

Penelitian disusun menurut Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang diulang 4 kali. Faktor pertama adalah media yang terdiri dari 2 taraf, yaitu media MS dan media PSC (Penn State Cacao). Faktor kedua adalah organ bunga terdiri dari 5 taraf, yaitu petala, staminodia, anthera, dasar bunga, dan putik. Bahan tanam yang digunakan dalam percobaan ini adalah bunga dari klon kakao DR1 yang diperoleh dari kebun koleksi kakao milik Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia di Kaliwining - Jember. Setelah dilakukan analisis varians, uji perbandingan rata-rata perlakuan digunakan Uji Tukey pada taraf nyata 5%.

Eksplan dipilih dari organ-organ kuncup bunga kakao dengan panjang 3-6 mm yang meliputi mahkota bunga, staminodia, anthera, dasar bunga dan putik. Eksplan diambil pada waktu pagi hari dari pohon

Tabel 1. Komposisi media MS dan PSC pada setiap tahap percobaan

Tahapan	Media M 1 (Media MS)	Media M 2 (Media PSC)
Inisiasi & Induksi	<ul style="list-style-type: none"> Media dasar MS dengan penambahan 2,4-D, Adenin 0,25 mg.L⁻¹, Sukrosa 30 g.L⁻¹ dan <i>phytagel</i> 2 g.L⁻¹. Eksplan yang telah berkalus dipindah ke media induksi dengan komposisi media sama dengan media inisiasi, tetapi tanpa zat pengatur tumbuh. Sub kultur dilakukan 2 kali dengan interval 3 minggu. pengamatan dilakukan terhadap eksplan dengan kalus embriogenik dan jumlah embrio per eksplan. 	<ul style="list-style-type: none"> Ditanam dalam media <i>PCG</i>⁾ 25-30 ml selama 14 hari. Pindahkan eksplan ke media <i>SCG</i>⁾ 25-30 ml selama 14 hari.
Multiplikasi	<ul style="list-style-type: none"> Embrio somatik yang diperoleh selanjutnya diperbanyak di media multiplikasi yaitu media MS dengan penambahan NAA 0,01 mg.L⁻¹; 2iP 0,3 mg.L⁻¹; <i>charcoal</i> 1 g.L⁻¹; glukosa 40 g.L⁻¹ dan <i>phytagel</i> 3 g.L⁻¹. Sub kultur dilakukan 3 kali dengan interval 3 minggu. Pada setiap sub kultur dilakukan pengamatan terhadap jumlah eksplan yang menghasilkan embrio dan jumlah embrio somatik per eksplan (fase globular, hati, torpedo, kotiledon). 	<ul style="list-style-type: none"> Eksplan yang telah berkalus dipindah ke media induksi <i>ED</i>⁾ 30 ml, subkultur dilakukan selama 14 hari. Embrio somatik yang diperoleh (panjang ± 2 cm) diperbanyak pada media <i>PEC</i>⁾ 30 ml (6 - 10 embrio per botol) Sub kultur dilakukan dengan interval 30 hari.
Perakaran	<ul style="list-style-type: none"> Embrio yang telah berkecambah kemudian dipindah ke media pendewasaan untuk memperoleh planlet. Media pendewasaan terdiri dari media MS yang dilengkapi dengan glukosa 10 g.L⁻¹, <i>charcoal</i> 1 g.L⁻¹; dan <i>phytagel</i> 3 g.L⁻¹. 	<ul style="list-style-type: none"> Embrio dengan panjang 1 cm dipindah ke media pendewasaan yang mengandung media <i>SEC</i>⁾. Jumlah embrio 4 – 5 embrio per botol.

⁾ Keterangan: *PCG*=*Primary Callus Growth*; *SCG*=*Secondary Callus Growth*; *ED*=*Embryo Development*; *PEC*=*Primary Embryo Conversion*; *SEC*=*Secondary Embryo Conversion*.

induk, dipilih kuncup yang belum mekar dan disterilisasi di laboratorium.

Tahapan-tahapan percobaan meliputi tahap inisiasi, induksi, multiplikasi, dan perakaran. Untuk kedua jenis media, secara rinci disajikan pada Tabel 1.

Kuncup bunga kakao disterilisasi dengan menggunakan larutan kloroks 5% dengan penambahan 1 tetes Tween selama 10 menit sambil digojok. Kemudian dibilas dengan aquadest steril 3 kali sampai bersih. Selanjutnya, bunga dipisahkan sesuai bagian-bagiannya dan dikulturkan masing-masing sesuai perlakuan.

Pengamatan dilakukan terhadap:

1. Persentase eksplan berkalus (hari ke 12);
2. Persentase eksplan dengan kalus embriogenik.;
3. Kedinian pembentukan kalus (hari) .;
4. Persentase eksplan yang menghasilkan embrio (minggu ke 10).;
5. Jumlah embrio per eksplan.;
6. Persentase eksplan berakar dan berkecambah. ;
7. Jumlah akar per eksplan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap Inisiasi

Proses embriogenesis somatik diawali dengan pembentukan kalus pada jaringan eksplan. Ditinjau dari asal mula terbentuknya kalus dari kelima eksplan, yaitu petala, staminodia, anthera, dasar bunga dan putik, menunjukkan bahwa kalus terinisiasi dari bekas potongan eksplan. Media dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS (Murashige & Skoog, 1962), dan media PSC (Penn State Cacao, 2003) sesuai dengan perlakuan. Bahan tanaman yang digunakan adalah kakao klon DR1. Proses inisiasi diawali dengan pembengkakan pada eksplan yang dikulturkan, kemudian berkembang hingga akhirnya menutup seluruh permukaan eksplan. Secara umum, eksplan tidak terganggu oleh lendir karena jaringan organ bunga sedikit sekali menghasilkan lendir. Sel-sel penghasil lendir hanya dijumpai pada jaringan vegetatif tetapi tidak dijumpai pada jaringan generatif.

Hasil analisis varian (Anova) beberapa karakter yang diamati disajikan pada Tabel 7. Dari kelima organ bunga yang diuji

hanya petala, staminodia, dan ather yang membentuk kalus (Tabel 2). Kemampuan eksplan membentuk kalus sangat dipengaruhi oleh kandungan hormon endogen dan eksogen. Interaksi antara hormon endogen dan eksogen tersebut akan menimbulkan reaksi yang berbeda-beda pada jaringan

Tabel 7. Anova beberapa karakter yang diamati

Karakter yang diamati	Fh Sumber Variasi		
	Media (A)	Eksplan (B)	A x B
% Pembentukan kalus	37.81**	681.89**	8.73**
% Eksplan membentuk kalus embriogenik	11.55**	170.15**	4.47**
% Eksplan menghasilkan embrio	11.09**	2.85**	3.25**
Jumlah embrio per eksplan	1.03 ns	2.83*	0.26 ns
% Eksplan berakar	0.86 ns	3.27 *	0.39 ns

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata;

* = berbeda nyata; ns = berbeda tidak nyata

Tabel 2. Persentase pembentukan kalus pada beberapa bagian bunga (12 HST)

Bagian bunga	Media	
	MS	PSC
Petala	91,3 a A	100,0 a B
Staminodia	80,5 b A	98,5 a B
Anthera	12,8 c A	22,3 b B
Dasar bunga	0,0 d A	0,0 c A
Putik	0,0 d A	0,0 c A

Keterangan: Angka pada kolom yang sama apabila diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada baris yang sama apabila diikuti oleh huruf kapital yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut Uji Tukey pada taraf nyata 5%.

tanaman yang berbeda. Hal yang sama di tunjukkan oleh percobaan ini, di mana respon eksplan membentuk kalus dari kelima organ bunga berbeda-beda.

Pada hari ke 12, eksplan petala, staminodia, dan anthera menunjukkan pengkalusan pada media MS dan PSC, bahkan eksplan petala pada media PSC sudah seluruhnya berkalus (100 %). Pada media MS, pengkalusan eksplan petala mencapai 91,3%. Eksplan dasar bunga dan putik belum menunjukkan respons berkalus pada kedua media. Perkembangan yang maksimal rata-rata ditemui pada eksplan petala yang dikulturkan pada media PSC, dengan persentase yang signifikan terhadap media MS.

Pada eksplan staminodia, persentase berkalus pada media PSC dan media MS berbeda sangat nyata. Pada media PSC, persentase eksplan staminodia untuk berkalus antara 96%-100%, sedangkan pada media MS berkisar 74%-89%. Pada hari ke 12 eksplan anthera sudah berkalus, walaupun dalam persentase yang kecil. Persentase eksplan anthera berkalus pada media PSC berkisar antara 20%-24%, sedangkan pada media MS berkisar antara 12%-14%. Persentase pengkalusan eksplan anthera memang berjalan sangat lambat, dan kalus yang terbentuk umumnya kompak dan kecil kemungkinan menjadi kalus yang embriogenik.

Pada eksplan dasar bunga dan putik, sampai hari ke 12 belum menunjukkan inisiasi menjadi kalus, baik pada media MS maupun pada media PSC. Pengamatan munculnya kalus dilakukan hingga hari ke 12, karena periode ini merupakan proses terbentuknya kalus. Kalus yang muncul melebihi 12 hari umumnya perkembangannya kurang bagus, bahkan eksplan dalam keadaan tidak segar, kering atau bahkan mati (Winarsih *et al.* (2003) dan Masseret *et al.* (2008). Kalus merupakan proses awal pada embriogenesis somatik, sedangkan perkembangan kalus selanjutnya apakah mengarah pada struktur kompak atau embriogenik masih terus diamati sesuai dengan tahapan kultur.

Pada tahap inisiasi, media MS menggunakan media dasar MS yang diperkaya dengan 2,4-D dan adenin. Sedangkan pada media PSC, pada tahap inisiasi ini menggunakan formulasi media *primary callus growth* (PCG), dengan menggunakan media dasar DKW yang diperkaya dengan 2,4-D dan thidiazuron. Pada media MS, sub kultur dilakukan 2 kali dengan interval 3 minggu. Pada media PSC, tahap inisiasi meliputi tahap *primary callus growth* (PCG) dan dilakukan inkubasi selama 14 hari; kemudian tahap *secondary callus growth* (SCG) dan diinkubasi selama 14 hari. Diduga bahwa perbedaan perkembangan kalus pada eksplan yang dikulturkan pada kedua media karena perbedaan kandungan sitokinin ini.

Tahap Induksi

Kalus yang terbentuk pada media inisiasi kemudian dipindahkan ke media induksi untuk memacu pertumbuhan embrio. Pengamatan dilakukan sampai dengan minggu ke 10. Volume kalus semakin membesar, diduga kalus ini sudah mengalami pendewasaan (*maturation*).

Tabel 3. Persentase eksplan klon DR1 dengan kalus embriogenik (10 MST).

Bagian bunga	Media	
	MS	PSC
Petala	70,7 a A	95,5 a B
Staminodia	15,7 b A	19,0b A
Anthera	0,0 c A	5,6c A
Dasar bunga	0,0 c A	0,0c A
Putik	0,0 c A	0,0c A

Keterangan: Angka pada kolom yang sama apabila diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada baris yang sama apabila diikuti oleh huruf kapital yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut Uji Tukey pada taraf nyata 5%.

Volume kalus yang membesar ini bentuknya ada yang kompak, remah atau bahkan sudah ada yang berakar. Kalus yang kompak maupun berakar cenderung tidak embriogenik. Sedangkan yang remah (dicirikan oleh warna kecoklatan, berbentuk nodul) mempunyai kecenderungan untuk menjadi kalus yang embriogenik.

Tabel 3, menunjukkan eksplan petala pada media PSC menunjukkan persentase kalus embriogenik yang lebih tinggi dan berbeda sangat nyata dibanding eksplan petala pada media MS. Pada media MS, persentase eksplan petala dengan kalus embriogenik pada kisaran 52%-87,5%, sedang pada media PSC pada kisaran 90%-100 %. Secara umum eksplan petala mempunyai potensi lebih besar untuk menghasilkan kalus yang embriogenik (kalus yang mempunyai potensi untuk menghasilkan embrio) dibandingkan dengan eksplan yang lain, baik pada media MS maupun PSC.

Pada eksplan staminodia dengan kalus embriogenik tidak terdapat perbedaan yang nyata pada media MS dan PSC. Pada media MS, eksplan staminodia dengan kalus embriogenik berada pada kisaran 13,64%-21,05%. Sedangkan pada media PSC berada pada kisaran 14%-30%. Perbedaan antar eksplan pada media MS dan media PSC hanya terlihat pada eksplan petala, sedang pada eksplan staminodia, anthera, dasar bunga dan putik tidak terdapat perbedaan yang nyata.

Eksplan anthera sesungguhnya mempunyai potensi yang besar pada media PSC, tetapi persentasenya kecil sekali, sekitar 5,6%. Kalus yang terbentuk umumnya mempunyai struktur yang kompak dengan warna kalus putih dan berbongkah-bongkah. Eksplan dasar bunga dan putik tidak responsif sama sekali, baik di media MS maupun media PSC.

Pengamatan embrio somatik dilakukan pada minggu ke 10 setelah eksplan dikulturkan, karena biasanya sel-sel embriogenik dapat muncul pada kalus embriogenik umur 10 minggu. Pada penelitian ini respons positif dari eksplan dinyatakan dalam persentase eksplan berembrio yang dihitung berdasarkan jumlah eksplan yang dapat

menghasilkan embrio dari total eksplan yang dikulturkan. Tabel 4 menunjukkan sampai minggu ke 10 hanya media PSC yang menghasilkan embrio, sedangkan media MS belum menghasilkan embrio. Eksplan yang menghasilkan embrio pada media PSC terutama dijumpai pada eksplan petala (12,0 %), diikuti oleh eksplan staminodia (4,0 %) dan eksplan anthera (2,8 %). Menurut Traore *et al.* (2003), inisiasi embrio primer pada proses embriogenesis somatik diperlukan waktu antara 6 sampai 8 bulan, sedangkan pada penelitian ini dengan menggunakan media PSC inisiasi embrio somatik sudah dapat diamati mulai minggu ke 10 (umur 2,5 bulan), meskipun dengan persentase yang rendah.

Tabel 4. Persentase eksplan klon DR1 yang menghasilkan embrio (10 MST).

Bagian bunga	Media	
	MS	PSC
Petala	0,0 a A	12,0 a B
Staminodia	0,0 a A	4,0 ab A
Anthera	0,0 a A	2,8 b A
Dasar bunga	0,0 a A	0,0 b A
Putik	0,0 a A	0,0 b A

Keterangan: Angka pada kolom yang sama apabila diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada baris yang sama apabila diikuti oleh huruf kapital yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut Uji Tukey pada taraf nyata 5%.

Kecepatan regenerasi embrio somatik pada media PSC ini diduga karena pada tahap inisiasi dilakukan melalui 2 tahapan formulasi media dengan kandungan zat pengatur tumbuh yang berbeda. Tahap pertama dalam inisiasi menggunakan media *primary callus growth* (PCG), dimana eksplan diinkubasi selama 14 hari. Dalam formulasi PCG zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4-D dan thidiazuron. Hormon 2,4-D merupakan hormon paling potensial untuk

menginduksi kalus. Hal ini disebabkan 2,4-D memiliki gugus asam asetat yang mempunyai keaktifan biologis seperti IAA yang salah satu fungsinya dapat mendorong pembelahan sel (Wattimena, 1987). Sesuai dengan penelitian Li *et al.* (1998) bahwa konsentrasi thidiazuron pada media *primary callus growth* (PCG) mempengaruhi persentase eksplan membentuk embrio dan perkembangan embrio selanjutnya.

Tahap kedua dalam inisiasi media PSC adalah menggunakan formulasi media *secondary callus growth* (SCG), dengan menggunakan zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin, serta ditambah dengan air kelapa. Penelitian yang lebih mendalam menemukan bahwa efek air kelapa pada pertumbuhan menjadi lebih baik, bila dalam media juga diberikan auksin. Auksin tertentu dan air kelapa dapat bersifat sinergis.

Tahap Multiplikasi

Embrio somatik primer yang dihasilkan pada media induksi kemudian ditransfer ke media multiplikasi untuk mendapatkan embrio somatik sekunder dalam jumlah yang lebih banyak. Embrio somatik sekunder tumbuh dan berkembang dari sel-sel epidermis dan subepidermis melalui proses *budding* seperti yang dilaporkan oleh Pence (1992) dan Li *et al.* (1998). Pada penelitian ini respons embriogenesis somatik selain ditunjukkan oleh persentase eksplan yang dapat menghasilkan embrio, juga ditunjukkan oleh rata-rata jumlah embrio yang dihasilkan oleh tiap eksplan tersebut.

Pengamatan terhadap jumlah embrio per eksplan dilakukan pada saat yang bersamaan dengan persentase ekspansi menghasilkan embrio. Rata-rata jumlah embrio dihitung berdasarkan total eksplan yang dikulturkan.

Pada minggu ke 18 rata-rata jumlah embrio per eksplan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antar organ bunga dengan rata-rata pada kisaran 0 sampai 0,34 (media MS) dan pada kisaran 0,35 sampai 0,8 (media PSC). Kisaran kurang dari 1 menunjukkan bahwa tidak semua eksplan menghasilkan embrio. Perbedaan respons antar organ bunga (walaupun tidak signifikan)

diduga disebabkan adanya perbedaan dalam penyerapan zat pengatur tumbuh oleh setiap eksplan.

Tabel 5. Rata-rata jumlah embrio per eksplan (18 MST).

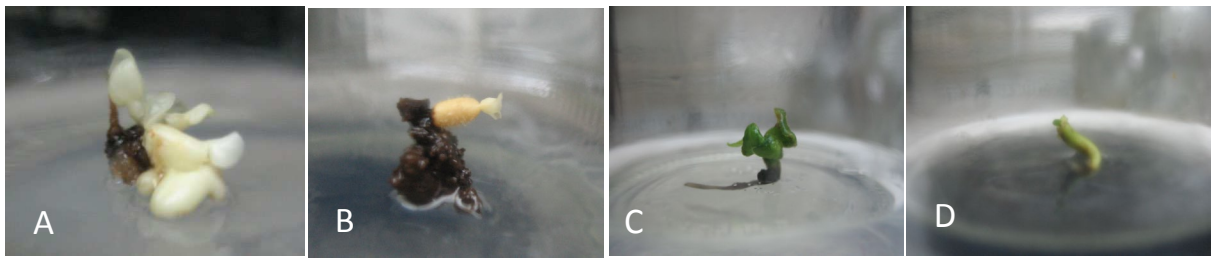
Bagian bunga	Media	
	MS	PSC
Petala	0,02 a A	0,35 a A
Staminodia	0,34 a A	0,45 a A
Anthera	0,0 a A	0,8 a A
Dasar bunga	0,0 a A	0,0 a A
Putik	0,0 a A	0,0 a A

Keterangan: Angka pada kolom yang sama apabila diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada baris yang sama apabila diikuti oleh huruf kapital yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut Uji Tukey pada taraf nyata 5%.

Tahap Perakaran

Embrio somatik yang sudah mencapai fase torpedo dikumpulkan dari semua ulangan dan perlakuan kemudian diseleksi untuk mendapatkan fase torpedo dan selanjutnya dipindah ke media perkecambahan. Perkembangan embrio yang normal dipengaruhi oleh komposisi media dan kondisi kultur selama proses perkecambahan.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa respons embrio somatik terhadap pertumbuhan akar lebih baik dibandingkan pertumbuhan tunas. Bila dirinci lebih lanjut, respons antar organ bunga juga menghasilkan perbedaan yang tidak nyata pada media MS. Sedangkan pada media PSC perlakuan antar organ bunga pada eksplan petala, staminodia dan anthera berbeda nyata terhadap ekspansi dasar bunga dan putik. Sampai dengan minggu ke 24 eksplan yang dikulturkan baik pada media MS maupun pada media PSC hanya menunjukkan respons berakar, dan belum menunjukkan respons bertunas (Gambar 1). Hal ini mungkin disebabkan



Gambar 1. A= Embrio petala pada media PSC; B= Embrio petala pada media MS;
C= Eksplan berakar pada media PSC; D= Eksplan berakar pada media MS.

keseimbangan konsentrasi auksin dan sitokinin dalam embrio yang kurang sesuai untuk proses perkecambahan. Konsentrasi auksin dalam embrio mungkin lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi sitokinin.

Tabel 6. Persentase eksplan berakar (24 MST).

Bagian bunga	Media	
	MS	PSC
Petala	13,3 a A	30,9 a A
Staminodia	12,5 a A	8,5 a A
Anthera	0,0 a A	12,5 a A
Dasar bunga	0,0 a A	0,0 a A
Putik	0,0 a A	0,0 a A

Keterangan: Angka pada kolom yang sama apabila diikuti oleh huruf kecil yang sama dan angka-angka pada baris yang sama apabila diikuti oleh huruf kapital yang sama menunjukkan berbeda tidak nyata menurut Uji Tukey pada taraf nyata 5%.

Tabel 6, menunjukkan bahwa pada media PSC, persentase eksplan berakar pada eksplan petala rata-rata 30,9 % dan pada media MS rata-rata 13,3 %. Sedangkan persentase eksplan berakar dari eksplan staminodia rata-rata 12,5 % (media MS) dan 8,5 % (media PSC). Dalam penelitian ini didapat bahwa eksplan anthera pada media PSC dapat berakar pada kisaran rata-rata 12,5 %, lebih tinggi 4 % dari persentase staminodia pada media PSC.

Secara umum hasil penelitian ini menunjukkan bahwa eksplan petala dan staminodia merupakan bagian eksplan yang sangat responsif. Meskipun demikian staminodia lebih sering digunakan karena persentase kontaminasinya lebih rendah dibandingkan petala.

Penelitian kemudian dilanjutkan untuk mengetahui perkembangan perakaran dan pertunasan dari eksplan. Sampai minggu ke 28 dari seluruh eksplan yang diakarkan pada media MS maupun media PSC menunjukkan berbeda tidak nyata terhadap jumlah akar per eksplan. Bila dirinci lebih lanjut, respons antar organ bunga juga menghasilkan perbedaan yang tidak nyata pada media MS dan PSC.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa media PSC memberikan respon lebih baik dibandingkan media MS pada tahap inisiasi dan induksi. Dari lima organ bunga yang dikulturkan, hanya petala, staminodia dan anthera yang mudah berkalus. Inisiasi kalus terbaik terjadi pada media PSC yang ditunjukkan oleh parameter persentase eksplan berkalus. Respon persentase kalus yang terbentuk pada 12 hari setelah tanam (HST) tertinggi terjadi pada eksplan petala (100%), diikuti staminodia (98,5%) dan anthera (22,3%). Pada tahap induksi, media PSC juga menjadi media terbaik dibandingkan media MS. Persentase eksplan menghasilkan embrio pada tahap induksi (10 minggu setelah tanam/MST) tertinggi dihasilkan oleh petala (12,0%) diikuti oleh staminodia (4,0 %) dan anthera (2,8 %).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh proyek KKP3T 2008. Terimakasih diucapkan kepada ICCRI dan Politeknik Negeri Jember atas bantuan klon-klon kakao yang digunakan dalam penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alemanno, L., M. Berthouly., & N. Michaux-Ferriere. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues in *Theobroma cacao L.* *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 46: 187-194.
- Edwin, F., George., S.M. David., Puttock; & Heather J. George. 1987. *Plant Culture Media: Formulation and Uses*. Volume 1. Exegetics Limited.
- Lopez-Baez, O., H. Bollon., A.B. Eskes., & V. Petiard. 1993. Embryogenese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao L.* a partir de pieces florales. *CR Acad. Sci. Paris*. 316: 579-584.
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., & Gultinan, M.J. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao L.*) using thidiazuron. Department of Horticulture, College of Agricultural Sciences, The Pennsylvania State University Park, Pennsylvania 16802-4200.
- Mark, G.J. & Maximova, S.N., 2000. Recent advance in the tissue culture of cocoa from somatic embryos to bentwood gardens. ACRI Molecular Biology Laboratory, Tyson Building, The Pennsylvania State University, University Park, PA, 16802.
- Masseret, B., Vachet, C., Florin, B., Gianforcaro, M., Filloudeau, A., Brulad, E., Bouquet, JF., Alvarez, M., & Broun, P. 2008. Propagation of cacao (*Theobroma cacao L.*) by somatic embryogenesis and field performance on the trees. Nestle R & D Centre, Tours, France. Presented in 2008 Indonesian Cocoa Symposium, Denpasar (Bali) 28-29 October 2008.
- Maximova, S.N., Alemanno, L., Young, A., Ferriere, N., Traore, A., & Gultinan, M.J. 2002. Efficiency, genotypic variability, and cellular origin of primary and secondary somatic embyogenesis of *Theobroma cacao L.* *In Vitro Cell. Dev. Biol, Plant*, 38:252-259.
- Murashige T. & Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15:473-497.
- Pence, V.C. 1992. Abscisic acid and the maturation of cacao embryos in vitro. *Plant Physiol*, 98:1391-1395.
- Penn State Cacao Research Lab. 2003. Cacao tissue culture protocol book. Version 1.4 The Pennsylvania State University, Department of Horticulture, USA.
- Puslitkoka Jember. 2006. Bahan pertemuan dengan produsen kakao di Jakarta. Puslitkoka 3 Juli 2006. Jember
- Rahardjo, P., & Wahjudi, T. 2006. Dukungan pusat percobaan kopi dan kakao dalam penyediaan benih kakao. Pertemuan Teknis Perbenihan Perkebunan, Direktorat Jendral Perkebunan 27-29 Agustus 2006, Denpasar, Bali.
- Ragapadmi, P. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin AgroBio*, 5(2):51-58.
- Tahardi, J.S & N. Mardiana. 1995. *Cocoa Regeneration via Somatic Embriogenesis*. *Menara Perkebunan*. 52: 174-178.

- Traore, A., Maximova, S.N., & Gultinan, M.J. 2003. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using somatic embryo-derived plants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 1:1-7.
- Wattimena, G.A., 1987. Zat pengatur tumbuh tanaman. Lab Kultur Jaringan, PAU Bioteknologi IPB, Dirjen
- Dikti, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.
- Winarsih, S., Santoso, D., & Wardiyati, T. 2003. Embriogenesis somatic dan regenerasi tanaman pada kultur in vitro organ bunga kakao. *Pelita Perkebunan*, 19(1): 1-16.