

PENGARUH KOMPOSISI MEDIA DASAR DAN JENIS EKSPLAN TERHADAP PEMBENTUKAN EMBRIO SOMATIK KAKAO

EFFECT OF BASAL MEDIUM COMPOSITION AND EXPLANT TYPE ON THE FORMATION OF CACAO SOMATIC EMBRYO

* Nur Ajijah

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
Jalan Raya Pakuwon Km 2, Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia
* jijah_ridwan@yahoo.co.id

(Tanggal diterima: 12 Agustus 2016, direvisi: 30 Agustus 2016, disetujui terbit: 28 Oktober 2016)

ABSTRAK

Komposisi media dasar sangat menentukan keberhasilan proses regenerasi di dalam kultur *in vitro*. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh komposisi media dasar pada media induksi kalus primer dan jenis eksplan terhadap pembentukan embrio somatik kakao. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian Balitbangtan, Bogor, mulai bulan Juni 2014 sampai Desember 2015. Induksi kalus primer dari eksplan mahkota bunga dan staminoid kakao klon ICCRI 4 menggunakan dua jenis media dasar, yaitu media Driver dan Kuniyuki (DKW) + 2,4-D 9 μM + kinetin 1,16 μM dan *woody plant media* (WPM) + 2,4-D 9 μM + kinetin 1,16 μM . Setelah 14 hari, kalus disubkultur pada media induksi kalus sekunder (WPM + 2,4-D 9 μM + kinetin 0,58 μM), kemudian pada media DKW tanpa zat pengatur tumbuh untuk menginduksi pembentukan embrio somatik. Penelitian disusun dalam rancangan faktorial dua faktor dengan 5 ulangan. Faktor pertama adalah jenis media dasar pada media induksi kalus primer (DKW dan WPM), sedangkan faktor kedua adalah jenis eksplan (mahkota bunga dan staminoid). Hasil penelitian menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang nyata antara jenis media dasar dan jenis eksplan terhadap pembentukan kalus dan embrio somatik kakao. Persentase pembentukan kalus paling tinggi diperoleh pada penggunaan media dasar DKW dengan eksplan staminoid (92,5%). Akan tetapi, persentase pembentukan embrio somatik dan jumlah embrio somatik per eksplan paling tinggi diperoleh pada perlakuan media dasar DKW dengan eksplan mahkota bunga (36,5% dan 2,30). Dengan demikian, penggunaan media dasar DKW dan eksplan mahkota bunga lebih direkomendasikan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik kakao klon ICCRI 4.

Kata kunci: DKW, eksplan, embrio somatik, kalus, WPM

ABSTRACT

The composition of basal medium determines the regeneration success of in vitro culture. The study aimed to evaluate the effect of basal medium in the primary callus induction medium and explant type on the formation of cacao somatic embryo. The research was conducted at the Tissue Culture Laboratory of IAARD, Bogor, from June 2014 to December 2015. Primary callus induction derived from staminoid and petal explants of ICCRI 4 clone used two types of basal medium, i.e. DKW + 9 μM 2.4-D + 1.16 μM kinetin or WPM + 9 μM 2.4-D + 1.16 μM kinetin. After 14 days, callus was subcultured onto secondary callus induction medium (WPM + 2.4-D 9 μM + kinetin 0.58 μM), and then onto DKW medium without growth regulators to induce the formation of somatic embryo. The research was designed in two-factor factorial design with five replications. The first factor was the type of basal medium on the primary callus induction medium (DKW and WPM) and the second factor was the type of explants (petal and staminoid). The results showed significant interaction effect between basal medium type and explant type on the formation of callus and somatic embryo of cacao. The highest percentage of callus formation was derived from staminoid explants on the DKW basal salt medium (92.5%). However, the highest percentage of somatic embryo formation and the number of somatic embryo per explant were obtained from DKW basal salt medium with petal explants (36.5% and 2.3). Therefore, the use of DKW basal salt medium and petal explant were recommended for the induction of somatic embryo of the ICCRI 4 clone.

Keywords: DKW, explant, somatic embryo, callus, WPM

PENDAHULUAN

Pertanaman kakao di Indonesia sebagian besar berumur tua dan telah melampaui umur ekonomis sehingga produktivitasnya semakin menurun. Upaya peremajaan melalui penanaman baru memerlukan ketersediaan benih dalam jumlah besar. Namun, penyediaan benih klon-klon unggul kakao melalui perbanyakan klonal secara konvensional masih dihadapkan pada kendala faktor multiplikasi yang rendah. Teknologi kultur jaringan, di antaranya embriogenesis somatik, diharapkan mampu mengatasi kendala tersebut.

Zat pengatur tumbuh, faktor genetik, jenis eksplan, dan komposisi media dasar memegang peranan sangat penting dalam proses embriogenesis somatik yang diinduksi secara *in vitro*. Media dasar menyediakan unsur hara makro, mikro, dan vitamin yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan jaringan eksplan. Pada proses induksi embriogenesis somatik secara *in vitro*, peran media adalah menyediakan nutrisi bagi proses pembentukan kalus serta pembentukan dan perkembangan embrio somatik. Pada proses ini nutrisi hanya disuplai dari media karena tidak ada koneksi dengan jaringan induk seperti pada pertumbuhan dan perkembangan embrio zigotik. Menurut Noormohammadi, Farahani, & Safarzadeh (2013), salah satu faktor paling penting pada proses regenerasi tanaman secara *in vitro* adalah unsur hara makro dan mikro serta vitamin yang spesifik pada setiap media dasar. Berbagai formulasi media dasar memiliki komposisi hara berbeda sehingga pemilihan media dasar yang tepat sangat diperlukan untuk memberikan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhan dan perkembangan eksplan di dalam kultur.

Beberapa jenis media dasar telah digunakan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik pada kakao, di antaranya media Murashige dan Skoog (MS) (Avivi, Prawoto, & Oetami, 2010), media Driver dan Kuniyuki (DKW) (Tan & Furtek, 2004), serta gabungan penggunaan media DKW dan *woody plant media* (WPM) (Li, Traore, Maximova, & Guiltinan, 1998). Berbagai media dasar tersebut memiliki perbedaan kandungan hara makro dan mikro di dalamnya (Tabel 1).

Metode yang dikembangkan oleh Li *et al.* (1998), yaitu menggunakan media dasar DKW dan WPM, merupakan metode yang paling banyak diterapkan dan dilaporkan efektif untuk rentang genotipe yang luas. Li *et al.* (1998) menggunakan dua tahapan induksi kalus, yaitu induksi kalus primer menggunakan media DKW dan pertumbuhan kalus sekunder pada media WPM. Menurut Li *et al.* (1998), kultur kalus yang lebih lama pada media dasar DKW menghasilkan pertumbuhan kalus yang intensif dan

mengurangi pembentukan embrio somatik. Sementara itu, penggunaan media WPM dengan kandungan hara lebih rendah pada media pertumbuhan kalus sekunder dapat meningkatkan respons embriogenik kalus. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan media dengan kandungan hara yang lebih rendah memberikan hasil lebih baik untuk perkembangan kultur. Pada embriogenesis somatik tanaman anggrek *Coelogyne cristata*, media 1/2 MS memberikan hasil lebih baik dibandingkan dengan media MS penuh (Naing, 2011). Demikian juga pada tanaman *Barringtonia racemosa*, penggunaan media dasar WPM memberikan hasil lebih baik untuk mendukung perkembangan kalus dibandingkan dengan media B5. Di sisi lain, media B5 dinilai lebih baik dibandingkan dengan media MS (Behbahani, Shanehsazzadeh, & Hessami, 2011). Namun demikian, menurut Saad & Elshahed (2012) konsentrasi hara media yang optimum untuk pertumbuhan dan perkembangan kultur berbeda untuk setiap spesies tanaman, bergantung pada kebutuhan nutrisi masing-masing. Pada embriogenesis somatik tanaman kurma, formulasi media yang optimum bahkan berbeda untuk setiap kultivar dan tahap perkembangan kultur.

Tabel 1. Kandungan hara pada beberapa media dasar
Table 1. The nutrient content in several types of basal medium

	Jenis media		
	DKW	MS	WPM
Unsur makro (mM)			
NH ₄ ⁺	17,7	20,6	5,0
NO ₃ ⁻	34,4	39,4	9,7
PO ₄ ⁻	2,0	1,3	1,3
SO ₄ ⁻	12,3	1,7	7,2
K ⁺	20,0	20,0	12,6
Mg ⁺	3,0	1,5	1,5
Ca ⁺	9,3	3,0	3,0
Cl ⁻	2,0	6,0	1,3
Fe ⁺⁺	0,1	0,1	0,1
Na ⁺	0,3	0,2	0,2
Unsur mikro (µM)			
B ⁺⁺⁺	77,6	100,0	100,0
Co ⁺⁺	-	0,1	-
Cu ⁺⁺	1,0	0,1	1,0
Γ	-	5,0	-
Mn ⁺⁺	198,0	100,0	132,0
MoO ₄ ⁻	1,6	1,0	1,0
Ni ⁺	0,02	-	-
Zn ⁺⁺	57,2	29,9	29,9
Total N	52,1	60,0	14,8
NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	1,9	1,9	2,0

Sumber/Source: Bell, Srinivasan, & Lomberk (2009)

Belum diketahui apakah media WPM dapat digunakan pada tahap awal induksi kalus primer untuk

pembentukan embrio somatik kakao dan apakah terdapat perbedaan respons eksplan terhadap komposisi media dasar. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh komposisi media dasar pada media induksi kalus primer dan jenis eksplan terhadap pembentukan embrio somatik kakao.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian (UPBUIP) Balitbangtan, Bogor, mulai bulan Juni 2014 sampai Desember 2015.

Persiapan Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah bunga kakao yang masih kuncup berumur sekitar 3 minggu dari klon ICCRI 4, koleksi Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Badan Litbang Pertanian. 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.

Uji Pengaruh Media Dasar dan Jenis Eksplan terhadap Pembentukan Kalus

Induksi kalus dilakukan menggunakan metode Li *et al.* (1998) yang dimodifikasi. Kalus diinduksi dari eksplan mahkota bunga dan staminoid pada media induksi kalus primer (*primary callus induction*) selama 14 hari. Kemudian, kalus disubkultur pada media induksi kalus sekunder (*secondary callus growth*) selama 14 hari. Media induksi kalus primer terdiri dari media dasar DKW atau WPM, tergantung perlakuan, dengan penambahan glutamin 250 mg/l, glukosa 20 g/l, pematat *phytagel* 2 g/l, serta zat pengatur tumbuh (ZPT) *dichlorophenoxyacetic acid* (2.4-D) 9 μ M dan kinetin 1,16 μ M. Media induksi kalus sekunder terdiri dari media dasar WPM dengan penambahan air kelapa 50 ml/l, glukosa 20 g/l, pematat *phytagel* 2,2 g/l, serta ZPT dan kinetin masing-masing 2.4-D 9 μ M dan 1,16 μ M (Ajijah, Hartati, Rubiyo, Sukma, & Sudarsono, 2016). Modifikasi yang dilakukan meliputi penggantian *thidiazuron* pada media induksi kalus primer dengan kinetin dan penurunan konsentrasi kinetin pada media induksi kalus sekunder dari 1,40 μ M menjadi 1,16 μ M. Perlakuan disusun dalam rancangan faktorial dua faktor dengan jenis media dasar (DKW dan WPM) pada media induksi kalus primer sebagai faktor pertama dan jenis eksplan (staminoid dan mahkota bunga) sebagai faktor ke dua. Setiap perlakuan diulang lima kali dan setiap unit percobaan terdiri dari sepuluh eksplan. Pengamatan

dilakukan terhadap persentase pembentukan kalus umur 28 hari setelah kultur atau setelah eksplan dikulturkan pada media induksi kalus sekunder. Kultur diinkubasi pada suhu 24°C–26°C dalam keadaan gelap.

Uji Pengaruh Media Dasar dan Jenis Eksplan terhadap Pembentukan Embrio Somatik

Setelah 14 hari dalam media induksi kalus sekunder, kalus yang diinduksi dari eksplan staminoid dan mahkota bunga menggunakan media DKW atau WPM dipindahkan ke dalam media DKW tanpa ZPT. Selanjutnya, kalus disubkultur setiap dua minggu ke dalam media yang sama sampai terbentuk embrio somatik fase globular, hati, torpedo, dan kotiledon dewasa. Kultur diinkubasi pada suhu 24°C–26°C dalam keadaan gelap. Pengamatan dilakukan terhadap persentase eksplan membentuk embrio somatik fase globular, hati, torpedo, dan kotiledon dewasa serta jumlah total embrio somatik fase globular, hati, torpedo, dan kotiledon dewasa per eksplan pada 12 minggu setelah kultur (MSK).

Perkecambahan Embrio Somatik dan Pembesaran Planlet

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

Pengamatan Mikroskopik

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.

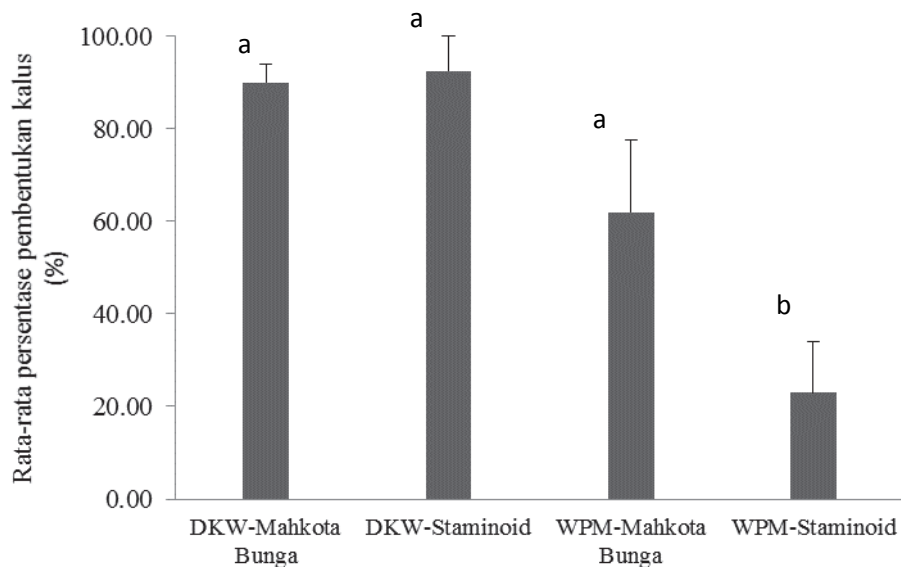
Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis ragam, dan bila hasilnya nyata maka dilanjutkan dengan uji beda rata-rata menggunakan uji Duncan pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Media Dasar dan Jenis Eksplan terhadap Pembentukan Kalus

Jenis media dasar pada media induksi kalus primer dan interaksinya dengan jenis eksplan berpengaruh nyata (masing-masing pada $p=0,000$ dan $p=0,033$) terhadap rata-rata persentase pembentukan kalus kakao klon ICCRI 4 umur 28 hari setelah kultur. Pengaruh jenis eksplan secara tunggal tidak nyata ($p=0,055$). Eksplan mahkota bunga dan staminoid menunjukkan respons pembentukan kalus yang berbeda pada kedua jenis media dasar yang diuji.



Gambar 1. Pembentukan kalus kakao klon ICCRI 4 dari eksplan mahkota bunga dan staminoid yang diinduksi menggunakan media dasar DKW atau WPM 28 hari setelah kultur. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%. Bar mengindikasikan standar error (SE)

Figure 1. Callus formation of ICCRI 4 clone derived from petal and staminoid explants induced using DKW or WPM basal salt medium at 28 days after culture. The same letters are not significantly different according to Duncan's test at 5% level. Bars indicate the standard error (SE)

Penggunaan media dasar DKW pada media induksi kalus primer memicu respons pembentukan kalus yang lebih tinggi pada eksplan staminoid (92,5%) dibandingkan dengan mahkota bunga (90,0%), meskipun secara statistik tidak berbeda nyata. Sebaliknya, mahkota bunga menunjukkan respons pembentukan kalus lebih tinggi (62%) dan berbeda nyata dibandingkan dengan staminoid (23%) apabila digunakan media WPM (Gambar 1). Adanya perbedaan respons pembentukan kalus di antara organ bunga kakao juga telah dilaporkan sebelumnya (Avivi, Hardjosoedarmo, & Hartanto, 2012; Ajijah, Rubiyono, & Sudarsono, 2014; Ajijah *et al.*, 2016). Perbedaan kemampuan setiap jenis eksplan (hipokotil, kotiledon, dan akar) dalam membentuk kalus juga ditunjukkan pada tanaman *Raphanus sativus* L. (Aazami & Pouraghdam, 2009). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kandungan hormon endogen pada masing-masing jenis eksplan. Menurut Jimenez (2005), kandungan hormon endogen berperan sangat penting di dalam penentuan respons embriogenik suatu eksplan.

Pembentukan kalus merupakan tahapan yang sangat penting di dalam proses regenerasi melalui embriogenesis somatik secara tidak langsung dan hanya kalus yang bersifat embriogenik yang mampu membentuk embrio somatik. Beberapa hasil penelitian sebelumnya melaporkan komposisi media dasar sangat berpengaruh terhadap keberhasilan pembentukan kalus. Ahmed, Rao, Rao, & Taha (2011) melaporkan

penggunaan media dasar MS untuk menginduksi kalus dari eksplan batang dan daun tanaman *Phylla nodiflora*. Rata-rata persentase pembentukan kalus embriogenik yang dihasilkan lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan media dasar B5, SH, dan WPM, walaupun ZPT yang digunakan sama. Sementara itu, Cardoso, Martinelli, & Latado (2012) melaporkan penggunaan media dasar WPM yang dilanjutkan dengan media dasar N6 (WPM-N6) untuk menginduksi kalus tanaman jeruk cv Tobias. Rata-rata persentase pembentukan kalus, ukuran kalus, dan persentase pembentukan kalus embriogenik lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan media N6-N6, N6-WPM dan WPM-WPM. Pada penelitian ini penggunaan media DKW pada media induksi kalus primer menghasilkan rata-rata persentase pembentukan kalus lebih tinggi dibandingkan dengan media WPM (Gambar 1). Hal ini kemungkinan disebabkan media DKW memiliki kandungan hara yang lebih tinggi dibandingkan media WPM (Tabel 1).

Pada tahap awal induksi kalus memerlukan media dasar dengan kandungan hara lebih tinggi untuk menginisiasi pembelahan sel. Hasil penelitian Avivi *et al.* (2012) juga menunjukkan induksi kalus dari organ bunga (mahkota bunga, staminoid, dan anter) beberapa klon kakao menggunakan protokol berbasis media DKW menghasilkan persentase pembentukan kalus lebih tinggi dibandingkan dengan protokol berbasis media MS. Media DKW diketahui memiliki kandungan

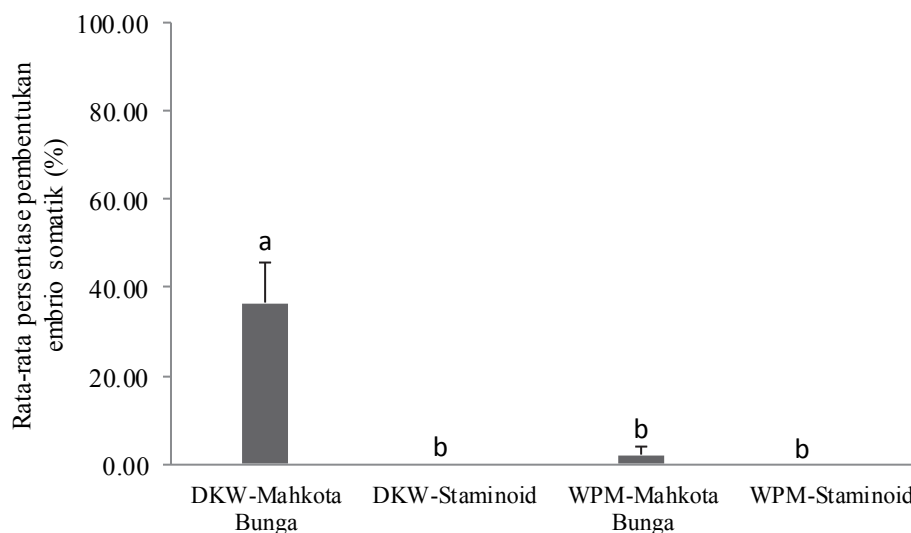
fosfor (PO_4^-), sulfur (SO_4^-), magnesium (Mg^+), dan kalsium (Ca^+) lebih tinggi dibandingkan dengan media dasar MS dan WPM (Tabel 1). Unsur Ca berperan di dalam pemanjangan dan pembelahan sel, pembentukan, dan penstabilan dinding sel, mempertahankan struktur dan permeabilitas membran sel, meregulasi berbagai respons sel, serta berfungsi sebagai ion pengatur di dalam translokasi karbohidrat (Aranda-Peres, Pereim Peres, Higashi, & Martinelli, 2009; Soetan, Olaiya, & Oyewole, 2010). Fosfor berfungsi sebagai komponen asam nukleat dan koenzim, sulfur berperan sebagai komponen protein, vitamin, dan koenzim, sedangkan magnesium berperan sebagai kofaktor enzim (Soetan *et al.*, 2010). Hal ini diduga menjadi penyebab media DKW menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan media MS dan WPM untuk menginduksi pembentukan kalus pada kakao.

Pengaruh Media Dasar dan Jenis Eksplan terhadap Pembentukan Embrio Somatik

Jenis media dasar pada media induksi kalus primer berpengaruh sangat nyata terhadap rata-rata persentase eksplan membentuk embrio dan jumlah embrio somatik per eksplan kakao klon ICCRI 4 pada 12 MSK ($p=0,001$; $p=0,001$), demikian juga dengan

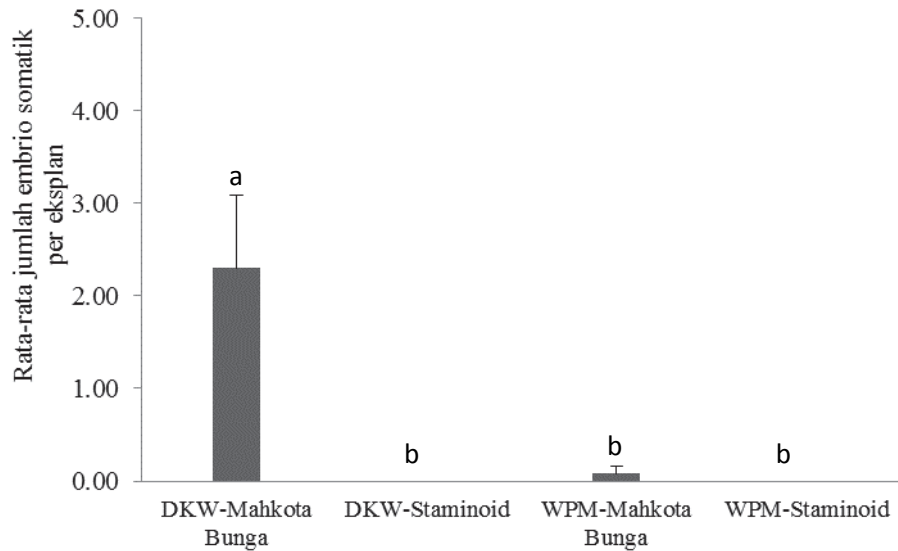
pengaruh jenis eksplan ($p=0,000$; $p=0,000$) serta interaksi media dan jenis eksplan ($p=0,001$; $p=0,001$). Embrio somatik dapat terbentuk dari kalus yang diinduksi dari eksplan mahkota bunga, baik menggunakan media dasar DKW maupun WPM (Gambar 2). Namun, kalus yang diinduksi menggunakan media DKW menghasilkan rata-rata persentase pembentukan embrio somatik dan jumlah embrio somatik nyata lebih banyak (36,5% dan 2,30) dibandingkan dengan eksplan yang sama namun diinduksi menggunakan media WPM yang hanya mencapai 2% dengan jumlah embrio 0,08 (Gambar 2 dan 3).

Beberapa hasil penelitian melaporkan komposisi media dasar yang digunakan untuk menginduksi kalus sangat menentukan kemampuan embriogenik kalus yang dihasilkan. Cardoso *et al.* (2012) melaporkan penggunaan media dasar WPM dilanjutkan dengan media dasar N6 (WPM-N6) untuk menginduksi kalus tanaman jeruk cv Tobias menghasilkan persentase pembentukan embrio somatik dan perkecambahan embrio somatik lebih tinggi dibandingkan penggunaan media N6-N6, N6-WPM dan WPM-WPM.



Gambar 2. Persentase pembentukan embrio somatik kakao klon ICCRI 4 dari kalus yang diinduksi dari eksplan mahkota bunga dan staminoid menggunakan media dasar DKW dan WPM 12 minggu setelah kultur. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%. Bar mengindikasikan standar error (SE)

Figure 2. The percentage of somatic embryo formation of ICCRI 4 clone from callus that was induced by petal and staminoid explants using DKW and WPM basal medium at 12 weeks after culture. The same letters are not significantly different according to Duncan's test at 5% level. Bars indicate the standard error (SE)



Gambar 3. Total jumlah embrio somatik per eksplan yang terbentuk dari kalus yang diinduksi dari eksplan mahkota bunga dan staminoid kakao klon ICCRI 4 menggunakan media DKW dan WPM umur 12 minggu setelah kultur. Huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%. Bar mengindikasikan standar error (SE)

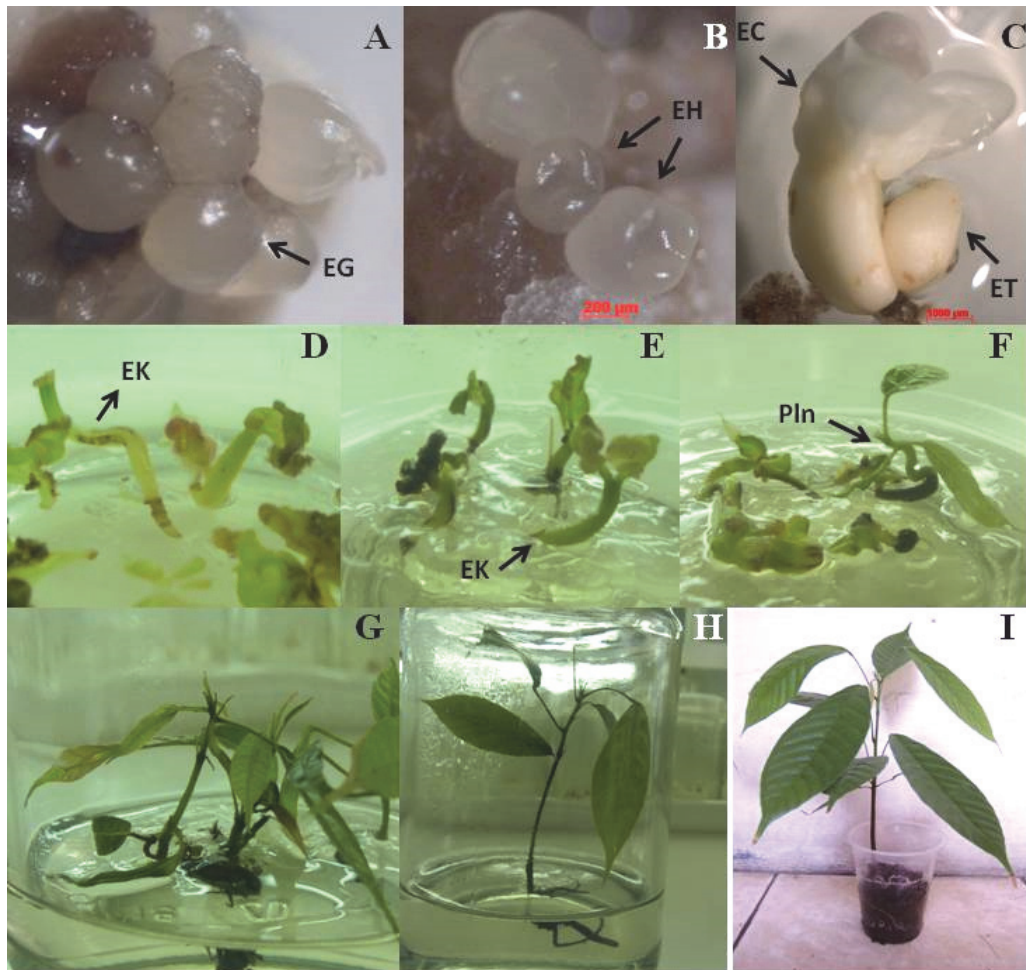
Figure 3. The number of somatic embryos per explant formed from callus that was induced from petal and staminoid explants of ICCRI 4 clone using DKW or WPM basal medium at 12 weeks after culture. The same letters are not significantly different according to Duncan's test at 5% level. Bars indicate the standard error (SE)

Beberapa hasil penelitian melaporkan keunggulan penggunaan media dasar DKW dibandingkan dengan media MS untuk menginduksi embriogenesis somatik pada kakao (Li *et al.*, 1998; Avivi *et al.*, 2012). Li *et al.* (1998) melaporkan bahwa penggunaan media dasar MS untuk kultur berbagai jenis eksplan kakao menghasilkan pertumbuhan kalus yang lambat, kemunduran lebih cepat, dan nekrotik pada jaringan. Sementara itu, penggunaan media dasar DKW menghasilkan pertumbuhan kalus embriogenik yang cepat serta meningkatkan pembentukan dan pertumbuhan embrio somatik. Avivi *et al.* (2012) juga melaporkan penggunaan protokol berbasis media dasar DKW menghasilkan persentase pembentukan embrio somatik dengan jumlah embrio somatik lebih banyak dibandingkan dengan protokol berbasis media MS.

Salah satu kelebihan media DKW adalah memiliki kandungan sulfur hampir dua kali lipat (12,23 mM) dibandingkan dengan media WPM (7,2 mM) dan hampir enam kali lipat dibandingkan dengan media MS (1,7 mM). Hasil penelitian Minyaka, Niemenak, Issali, Sangare, & Omokolo (2010) menunjukkan penghilangan sulfur dari media DKW (mengganti $MgSO_4$ dan K_2SO_4 dengan $MgCl_2$ dan KCl) di dalam media induksi kalus primer menurunkan persentase pembentukan embrio somatik secara nyata. Penurunan

semakin besar seiring lamanya kultur diinkubasi dalam media tanpa sulfur (menghilangkan sulfur pada media induksi kalus sekunder serta media induksi dan pendewasaan embrio somatik). Tidak adanya suplai sulfur di dalam media menghambat asimilasi sistein sintase yang penting untuk proses embriogenesis somatik pada kakao (Minyaka *et al.*, 2008).

Pada penelitian ini, tidak ada embrio terbentuk dari kalus yang diinduksi dari eksplan staminoid, baik menggunakan media DKW maupun WPM. Embrio somatik hanya terbentuk dari eksplan mahkota bunga (Gambar 2). Hasil ini mengindikasikan pada klon kakao ICCRI 4, eksplan mahkota bunga memiliki respons embriogenesis somatik lebih tinggi dibandingkan dengan staminoid. Pada tanaman kakao, respons embriogenesis somatik dari eksplan mahkota bunga dan staminoid sangat bervariasi tergantung genotipe. Berdasarkan hasil penelitian Ajjah *et al.* (2016), respons embriogenesis somatik yang lebih tinggi pada klon kakao Sca 6, UIT 1, ICS 13, DR 2, dan Cimanggu 1 ditunjukkan oleh eksplan staminoid, sedangkan klon Pa 300, GC 7, ICCRI 2, dan Cimanggu 2 ditunjukkan oleh eksplan mahkota bunga. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa eksplan mahkota bunga lebih direkomendasikan untuk digunakan di dalam menginduksi embriogenesis somatik pada kakao klon ICCRI 4.



Gambar 4. Pembentukan embrio somatik dan planlet kakao klon ICCRI 4 dari kalus yang diinduksi dari eksplan mahkota bunga menggunakan media dasar DKW: (A) embrio somatik fase globuler, (B) embrio somatik fase hati, (C) embrio somatik fase torpedo dan kotiledon, (D, E) perkecambahan embrio somatik, (F, G) pembentukan planlet, (H) planlet siap aklimatisasi, serta (I) tanaman pasca aklimatisasi. EC = embrio somatik fase kotiledon, EG = embrio somatik fase globuler, EK = embrio somatik yang sedang berkecambah, Pln = planlet

Figure 4. Formation of somatic embryos and plantlets of ICCRI 4 clone from callus induced from petal explants using DKW basal medium: (A) somatic embryo at globular phase, (B) somatic embryo at heart phase, (C) somatic embryos at torpedo and cotyledonary stage, (D, E) germination of somatic embryos, (F, G) formation of plantlets, (H) plantlets ready to be acclimatized and (I) post-acclimatization plants. EC = cotyledonary somatic embryo, EG = globular somatic embryo, EK = germination of somatic embryos, Pln = plantlets

Gambar 4 memperlihatkan tahapan perkembangan embrio somatik dan pembentukan planlet dari kalus yang diinduksi dari eksplan mahkota bunga klon kakao ICCRI 4 menggunakan media DKW. Embrio somatik berkembang melalui tahapan globuler (Gambar 4A), hati (Gambar 4B), torpedo (Gambar 4C), dan kotiledon (Gambar 4C). Pembentukan planlet diawali oleh perkecambahan embrio somatik (Gambar 4D dan 4E), selanjutnya pembentukan daun (Gambar 4F) dan planlet (Gambar 4F, 4G, dan 4H). Planlet kakao yang berasal dari embrio somatik memiliki akar tunggang dan daun normal, selanjutnya planlet diaklimatisasi. Benih kakao asal embrio somatik memiliki arsitektur seperti benih yang berasal dari biji (Gambar 4I).

KESIMPULAN

Persentase pembentukan kalus kakao klon ICCRI 4 paling tinggi diperoleh pada penggunaan eksplan staminoid menggunakan media dasar DKW (92,5%), diikuti eksplan mahkota bunga pada media dasar DKW (90%). Sementara itu, persentase pembentukan embrio somatik dan jumlah embrio somatik paling tinggi diperoleh pada penggunaan eksplan mahkota bunga, juga pada media DKW (36,5% dan 2,3 embrio per eksplan). Penggunaan media dasar DKW pada media induksi kalus primer dengan eksplan mahkota bunga lebih direkomendasikan untuk menginduksi pembentukan embrio somatik pada klon kakao ICCRI 4.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rr. Siti Masithoh dan Cindy Ameliyanti yang telah memberikan bantuan teknis selama kegiatan penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Aazami, M., & Pouraghdam, M. B. H. (2009). The effects of different culture media on the callus production of radish (*Raphanus sativus* L.). *Romanian Biotechnological Letters*, 14(4), 4519–4523.
- Ahmed, A. B. A., Rao, A. S., Rao, M. V., & Taha, R. M. (2011). Effect of picloram, additives and plant growth regulators on somatic embryogenesis of *Phyllanthus nodiflora* (L.) Greene. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(1), 7–13. doi: <http://doi.org/10.1590/S1516-89132011000100002>.
- 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.
- Aranda-Peres, A. N., Pereim Peres, L. E., Higashi, E. N., & Martinelli, A. P. (2009). Adjustment of mineral elements in the culture medium for the micropropagation of three *Vriesea bromeliads* from the Brazilian atlantic forest : The importance of calcium. *HortScience*, 44(1), 106–112.
- 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(11), 68–77.
- Avivi, S., Prawoto, A., & Oetami, F. (2010). Regenerasi embriogenesis somatik pada beberapa klon kakao Indonesia dari eksplan bunga. *J. Agron. Indonesia*, 38(2), 138–143.
- Behbahani, M., Shanesazzadeh, M., & Hessami, M. J. (2011). Optimization of callus and cell suspension cultures of *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae family) for lycopene production. *Scientia Agricola*, 68(1), 69–76. doi: <http://doi.org/10.1590/S0103-90162011000100011>.
- Bell, R. L., Srinivasan, C., & Lomber, D. (2009). Effect of nutrient media on axillary shoot proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 45(6), 708–714. doi: <http://doi.org/10.1007/s11627-009-9196-8>.
- Cardoso, J. C., Martinelli, A. P., & Latado, R. R. (2012). Somatic embryogenesis from ovaries of sweet orange cv. Tobias. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(1), 171–177. doi: <http://doi.org/10.1007/s11240-011-0073-x>.
- Jimenez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.*, 47, 91–110
- 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. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*, 34, 293–299.
- Minyaka, E., Niemenak, N., Issali, E. A., Sangare, A., & Omokolo, D. N. (2010). Sulphur depletion altered somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* L. Biochemical difference related to sulphur metabolism between embryogenic and non embryogenic calli. *African Journal of Biotechnology*, 9(35), 5665–5675.
- Minyaka, E., Niemenak, N., Koffi, K. E., Issali, E. A., Sangare, A., & Ndoumou Omokolo, D. (2008). Effect of MgSO₄ and K₂SO₄ on somatic embryo differentiation in *Theobroma cacao* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(2), 149–160. doi: <http://doi.org/10.1007/s11240-008-9398-5>.
- Naing, A. H. (2011). Plant Regeneration Through indirect somatic embryogenesis in *Coelogyne cristata* orchid. *American Journal of Plant Sciences*, 2(2), 262–267. doi: <http://doi.org/10.4236/ajps.2011.22028>.
- Noormohammadi, Z., Farahani, F., & Safarzadeh, M. (2013). Study of morphological traits changes in different media culture study of morphological traits changes in different media culture of two apple rootstocks (M26 and Mm106). *Malays. Appl. Biol*, 42(1), 25–33.
- Saad, A. I. M., & Elshahed, A. M. (2012). *Plant tissue culture media*. In Leva, A & Rinaldi, U. M. R. (Eds) *Recent advances in plant in vitro culture*. Chapter 2 (p. 30-40) doi: <http://doi.org/10.52670/BF02796489>. ISBN: 978-953-51-0787-3
- Soetan, K. O., Olaiya, C. O., & Oyewole, O. E. (2010). The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African Journal of Food Science*, 4(May), 200–222.
- Tan, C.L., Furtek, D. B. (2004). Recurrent embryogenesis and implications for genetic transfer in *Theobroma cacao* L. *Malaysian Cocoa J.*, 1, 28–35.