

Regenerasi Embrio Zigot Kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan Penambahan Kinetin pada Media B5

Regeneration of Cocoa Zygotic Embryo Using Kinetin in B5 Media

Sholeh Avivi

Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember

ABSTRACT

The objective of this research was intended to identify the influence of kinetin application on zygotic embryo regeneration of several cocoa plants and examine the most appropriate kinetin concentration for regeneration of several cocoa clones. This research was conducted at Laboratory of Plant Tissue Culture, Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Jember University. The research was designed by *Completely Randomized Factorial* Design within four replications. The first factor was 4 cocoa clones which consisted of DR 1, DR 2, ICS 13 and ICS 60. The second factor was 5 methods of zygotic embryo regeneration. Result showed that the best response of cocoa clone to kinetin concentration of all examined parameters was shown by DR 1 clone. Moreover, on initiation stage, the most appropriate kinetin concentration for regeneration of several cocoa clones was 2 ppm.

Keywords: Regeneration, zygotic embryo, kinetin

PENDAHULUAN

Kekurangan bibit kakao untuk program revitalisasi perkebunan kakao membutuhkan bibit sekitar 80 juta butir di tahun 2010 (Rahardjo & Wahyudi 2006). Kekurangan bibit tersebut tidak dapat lagi dipenuhi oleh lembaga penyedia bibit kakao yang memanfaatkan metode perbanyakan bibit konvensional (benih, setek, sambungan dan okulasi/entres). Dengan demikian metode perbanyakan masal bibit unggul kakao perlu segera ditemukan.

Metode perbanyakan vegetatif, walaupun lebih sulit, dapat menjadi alternatif terbaik karena dianggap akan menghasilkan bibit dengan kualitas yang sama dengan induknya dan seragam (Mark & Maximova 2000, Alemanno *et al.* 2007). Perbanyakan vegetatif dengan teknik kultur jaringan dapat digunakan untuk memecahkan kebutuhan bibit kakao tersebut karena mampu menghasilkan bibit dan planlet mikro dalam jumlah banyak, seragam, true of tipe, dalam waktu yang relatif singkat, dan tidak tergantung musim (Ragapadmi 2002).

Beberapa penelitian kultur jaringan untuk menghasilkan bibit kakao telah dilakukan banyak peneliti (Winarsih *et al.* 2003, Li *et al.* 1998, Mayolo *et al.* 2003, Alemanno *et al.*

2003, Funek *et al.* 2007). Penelitian-penelitian tersebut telah dapat menghasilkan planlet dari proses regenerasi eksplan kakao menjadi embrio somatik melalui jalur somatik embriogenesis (SE). Bahkan embrio somatik tersebut sudah dimanfaatkan untuk keperluan penyimpanan plasma nutfah (Fang *et al.* 2004).

Hingga saat ini masih dijumpai kendala perbanyakan kakao dengan kultur jaringan, terutama untuk klon-klon unggul Indonesia, diantaranya karena adanya produksi kalus, fenol, dan lendir yang berlebihan dari eksplan jaringan vegetatif sehingga menghambat proses regenerasi (Adu-Ampomsh *et al.* 1992, Winarsih & Priono 1995). Disamping itu reproduibilitas prosedur dan daya regenerasi masih tergolong rendah (Tahardi & Mardiana 1995).

Perbanyakan kakao melalui kultur jaringan yang dipandang cukup berhasil adalah perbanyakan dengan menggunakan eksplan bunga dan embrio zigot (Li *et al.* 1998, Winarsih *et al.* 2002). Perbanyakan dengan eksplan embrio zigot secara genetis sama dengan biji, dan dapat dimanfaatkan untuk memperbanyak embrio hibrida hasil seleksi tanpa menunggu buah masak untuk menghindari kegagalan panen akibat layu buah muda (Winarsih & Prion 1995).

Pemilihan eksplan dari jaringan embrio zigotik dalam SE juga ditujukan untuk

menghindari kendala produksi kalus, fenol dan lendir yang berlebih, karena produksi kalus, fenol dan lendir dari jaringan embrio zigotik sangat sedikit sehingga tidak mengganggu proses regenerasi (Winarsih *et al.* 2002). Penambahan zat pengatur tumbuh diharapkan dapat mengatasi kendala reproduibilitas prosedur dan kondisi regenerasi yang tergolong rendah.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui respon regenerasi embriozigot dari beberapa klon kakao yang diuji dan melihat efek pemberian kinetin pada tahap inisiasi terhadap daya regenerasi embriozigot kakao mulai tahap inisiasi hingga menghasilkan planlet pada tahap pendewasaan

METODE

Percobaan disusun menurut rancangan acak lengkap (RAL) faktorial yang diulang 4 kali. Faktor pertama adalah 4 klon kakao terdiri dari DR 1, DR 2, ICS 13, dan ICS 60. Faktor kedua adalah 5 metoda regenerasi embrio zigotik seperti tampak pada Tabel 1 (a,b,c,d,dan e). Untuk uji perbandingan rata-rata perlakuan digunakan Uji beda nyata jujur (BNJ) pada taraf nyata 5%.

Tahapan regenerasi dimodifikasi dari penelitian sebelumnya (Tahardi & Mardiana 1995, Winarsih *et al.* 2002). Tahapan regenerasi terdiri dari tahap inisiasi, induksi, multiplikasi dan pendewasaan.

Tahapan inisiasi

Embrio muda berumur 90–120 hari setelah fertilisasi (ukuran < 10 mm) dikeluarkan dari biji yang steril, lalu ditanam dalam media inisiasi. Masing–masing media inisiasi ditanami 5 eksplan. Kultur disimpan di ruang gelap pada suhu 26°C–28°C. Pengamatan dilakukan mulai 1 minggu setelah tanam (MST). Sub kultur dilakukan 3 kali dengan interval 3 minggu.

Tahapan induksi

Eksplan berkalus dari tahap inisiasi dipindah ke media induksi dengan komposisi media sama dengan media inisiasi, tetapi tanpa zat pengatur tumbuh. Sub kultur dilakukan 3 kali dengan interval 3 minggu.

Tahapan multiplikasi

Eksplan yang membentuk kalus embriogenik atau embrio somatik dipindah ke media multiplikasi untuk proses perbanyakan. Kultur dipertahankan di ruang gelap padasuhu 26°C–28°C selama 3 minggu. Sub kultur dilakukan 3 kali dengan interval 3 minggu.

Tahap pendewasaan

Embrio yang berkecambah dipindah ke media pendewasaan yang terdiri atas media dasar B5 dilengkapi dengan bahan tambahan seperti pada Tabel 1.

Parameter pengamatan dilakukan terhadap: persentase eksplan berkalus (12 MST), persentase eksplan membentuk kalus embriogenik (25 MST), rata-rata kedinian eksplan membentuk kalus embriogenik (pengamatan hingga 25 MST), jumlah embrio somatik fase torpedo (30 MST), persentase embrio somatik fase torpedo (30 MST), rata-rata jumlah akar per eksplan (36 MST) dan persentase eksplan berakar (36 MST).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan kalus pada tahap inisiasi

Inisiasi pembentukan kalus diawali dengan pembengkakan pada eksplan. Kemudian kalus mulai terbentuk pada pinggiran eksplan yang bersentuhan langsung dengan media. Kalus akan terus berkembang sampai menutupi seluruh permukaan eksplan. Menurut Winarsih *et al.* (2003), hampir semua jaringan pada kakao mempunyai sifat mudah berkalus.

Tabel 1. Rincian bahan yang ditambahkan ke dalam media dasar B5.

a. Metoda 1 : Media Dasar B5 ditambah

Tahap Penelitian			
Inisiasi	Induksi	Multiplikasi	Pendewasaan
IBA 3 mg/l; Air kelapa 100 ml/l; Sukrosa 30 g/l; Phytigel 2 g/l	Sukrosa 30g/l Phytigel 2g/l	NAA 0,01 mg/l; 2 iP 0,3 mg/l; Arang Aktif 1 g/l; Glukosa 40 g/l; Phytigel 2 g/l	Arang Aktif 0,3 g/l; Glukosa 10 g/l; Phytigel 2 g/l

b. Metoda 2 : Media Dasar B5 ditambah

Tahap Penelitian			
Inisiasi	Induksi	Multiplikasi	Pendewasaan
IBA 3 mg/l; Air kelapa 100 ml/l; Sukrosa 30 g/l; Phytigel 2 g/l; Kinetin 1 mg/l	Sukrosa 30g/l Phytigel 2g/l	NAA 0,01 mg/l; 2 iP 0,3 mg/l; Arang Aktif 1 g/l; Glukosa 40 g/l; Phytigel 2 g/l	Arang Aktif 0,3 g/l; Glukosa 10 g/l; Phytigel 2 g/l

c. Metoda 3 : Media Dasar B5 ditambah

Tahap Penelitian			
Inisiasi	Induksi	Multiplikasi	Pendewasaan
IBA 3 mg/l; Air kelapa 100 ml/l; Sukrosa 30 g/l; Phytigel 2 g/l; Kinetin 2 mg/l	Sukrosa 30g/l Phytigel 2g/l	NAA 0,01 mg/l; 2 iP 0,3 mg/l; Arang Aktif 1 g/l; Glukosa 40 g/l; Phytigel 2 g/l	Arang Aktif 0,3 g/l; Glukosa 10 g/l; Phytigel 2 g/l

d. Metoda 4 : Media Dasar B5 ditambah

Tahap Penelitian			
Inisiasi	Induksi	Multiplikasi	Pendewasaan
IBA 3 mg/l; Air kelapa 100 ml/l; Sukrosa 30 g/l; Phytigel 2 g/l; Kinetin 3 mg/l	Sukrosa 30g/l Phytigel 2g/l	NAA 0,01 mg/l; 2 iP 0,3 mg/l; Arang Aktif 1 g/l; Glukosa 40 g/l; Phytigel 2 g/l	Arang Aktif 0,3 g/l; Glukosa 10 g/l; Phytigel 2 g/l

e. Metoda 5 : Media Dasar B5 ditambah

Tahap Penelitian			
Inisiasi	Induksi	Multiplikasi	Pendewasaan
IBA 3 mg/l; Air kelapa 100 ml/l; Sukrosa 30 g/l; Phytigel 2 g/l; Kinetin 4 mg/l	Sukrosa 30g/l Phytigel 2g/l	NAA 0,01 mg/l; 2 iP 0,3 mg/l; Arang Aktif 1 g/l; Glukosa 40 g/l; Phytigel 2 g/l	Arang Aktif 0,3 g/l; Glukosa 10 g/l; Phytigel 2 g/l

Tabel 2. Persentase eksplan berkalus pada tahap inisiasi (12 MST).

[Kinetin]	Klon			
	DR 1	DR 2	ICS 13	ICS 60
0 ppm	96,4 abc	74,7 d	95,0 abc	94,5 abc
1 ppm	95,5 abc	52,6 e	75,0 d	77,5 d
2 ppm	98,8 ab	100,0 a	100,0 a	100,0 a
3 ppm	92,6 abc	90,6 bc	87,5 c	90,0 bc
4 ppm	97,22 ab	95,83 abc	95,83 abc	76,10 d

Keterangan : angka pada kolom dan baris dengan huruf yang sama, tidak berbeda nyata menurut uji BNJ pada taraf 5%.

Tabel 3 Persentase eksplan membentuk kalus embriogenik (25 MST).

[Kinetin]	Klon			
	DR 1	DR 2	ICS 13	ICS 60
0 ppm	100,0 a	83,5 bc	100,0 a	100,0 a
1 ppm	83,5 bc	41,5 e	83,5 bc	75,0 cd
2 ppm	100,0 a	100,0 a	91,8 ab	91,8 ab
3 ppm	100,0 a	83,5 bc	100,0 a	83,5 bc
4 ppm	100,0 a	83,3 bc	50,0 e	67,0 d

Keterangan : angka pada kolom dan baris dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNJ pada taraf 5%.

Rata-rata persentase eksplan berkalus tertinggi untuk semua klon (DR 1, DR 2, ICS 13 dan ICS 60) diperoleh pada konsentrasi kinetin 2 ppm (Tabel 2). Perbedaan respon setiap klon dapat disebabkan oleh karena kandungan zat pengatur tumbuh endogen yang berbeda, akibat perbedaan genetik antar klon, dan akibat perbedaan perlakuan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam media. Dari Tabel 2 tampak bahwa secara umum klon DR 2 menunjukkan persentase eksplan membentuk kalus paling kecil. Hal ini menunjukkan bahwa klon DR 2 mempunyai respon paling rendah terhadap media inisiasi kalus. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Winarsih *et al.* (2002) dan Fontanel *et al.* (2000).

Pembentukan kalus embriogenik pada tahap induksi

Respon tertinggi pembentukan kalus terhadap penambahan kinetin ditunjukkan oleh klon DR 1 dengan rata-rata jumlah dan persentase eksplan membentuk kalus embriogenik hampir seluruhnya 100%, kecuali pada konsentrasi 1 ppm (83,5%) (Tabel 3). Pada klon DR 2 rata-rata jumlah dan persentase eksplan membentuk kalus embriogenik tertinggi dicapai pada konsentrasi kinetin 2 ppm dan berbeda nyata dari kontrol dan konsentrasi kinetin lainnya.

Klon ICS 13 menunjukkan respon pembentukan kalus embriogenik per eksplan tertinggi pada kontrol dan konsentrasi kinetin 3 ppm yang tidak berbeda nyata dengan rata-rata jumlah dan persentase eksplan membentuk kalus embriogenik pada konsentrasi 2 ppm. Respon klon ICS 60 dalam rata-rata jumlah dan persentase pembentukan kalus embriogenik terbaik ditunjukkan oleh kontrol yang tidak berbeda nyata dengan hasil pada penambahan kinetin 2 ppm.

Menurut Tahardi & Mardiana (1995) penambahan auksin dan kinetin selama 2-4 minggu cukup optimum bagi pembentukan calon embrio (embrioid). Auksin menyebabkan berkembangnya embrioid yang akan berdiferensiasi lebih lanjut apabila auksin dihilangkan dari media. Embrio membentuk kalus cokelat yang friable, sedangkan kotiledon membentuk kalus kompak (Chantrapradist *et al.* 1995). Bagian kalus yang embriogenik dapat menghasilkan embrio melalui beberapa kali subkultur. Bagian kalus yang tidak embriogenik biasanya fluffy (seperti benang rambut halus), berwarna putih atau berwarna cokelat, mengkilat dan friable.

Kalus embriogenik dicirikan dengan munculnya embriosomatik berbentuk globuler pada bagian kalus tersebut. Tabel 4, menunjukkan bahwa respon klon paling dini terhadap pembentukan kalus embriogenik atau embrio somatik adalah ICS 13 tanpa penambahan kinetin (9,8 MST) dan tidak berbeda nyata dengan hasil pada konsentrasi 3 ppm. Sedangkan waktu yang paling lama untuk pembentukan kalus embriogenik ditunjukkan oleh klon DR 1 pada konsentrasi 3 ppm (22,5 MST). Respon paling dini pada klon DR 1 ditunjukkan oleh kontrol (10 MST) yang berbeda nyata dibanding dengan penambahan kinetin. Untuk klon DR 2 respon paling dini pada kinetin 2 ppm (10,8 MST) yang tidak berbeda nyata dengan hasil pada klon DR 2 konsentrasi kinetin 1 ppm dan 3 ppm. Klon ICS 60 respon paling dini ditunjukkan dengan penambahan 1 ppm (11 MST) yang berbeda nyata baik dengan kontrol maupun konsentrasi kinetin lainnya.

Menurut Traore *et al.* (2003), inisiasi dan induksi embrio primer pada proses embriogenesis somatik diperlukan waktu antara 6 sampai 8 bulan (24-32 minggu). Pada

penelitian ini embrio somatik paling dini terbentuk minggu ke-9 yang terjadi pada klon ICS 13. Embrio somatik paling lambat terbentuk minggu ke-25 yang terjadi pada klon DR 2. Menurut Maseret (2008), pada klon-klon yang sangat responsif, embrio primer dapat terbentuk mulai minggu ke 9. Dengan demikian Klon ICS 13 termasuk klon yang sangat responsif. Oleh karena itu pada penelitian ini, berdasarkan pertimbangan pembentukan embrio somatik menurut Traore (2003) dan Maseret (2008) perhitungan jumlah dan persentase eksplan membentuk embrio somatik ditentukan pada 25 MST, sedangkan untuk kediniannya pembentukan embrio somatik dari eksplan embrio zigotik mengambil rentang 1-25 MST.

Pembentukan embrio somatik jenis torpedo pada tahap multiplikasi

Embrio somatik yang tumbuh pada media induksi berbentuk globular dan hati, kemudian setelah disubkultur beberapa kali berubah menjadi bentuk torpedo. Embrio somatik yang dihasilkan pada media induksi kemudian dipindahkan ke media multiplikasi untuk mendapatkan embrio somatik yang lebih banyak. Istilah multiplikasi mengacu pada mulai terbentuknya embrio sekunder dari embrio primer, berbarengan dengan banyak terbentuknya embrio primer baru. Dengan demikian pada tahap multiplikasi terjadi pelipatan jumlah embriosomatik. (Maximova *et al.* 2002).

Rata-rata jumlah embrio somatik jenis torpedo pada Tabel 5 menunjukkan bahwa klon ICS 60 memberikan respon terbaik dari pada kontrol (11,3). Untuk klon DR 1 dan DR 2 rata-rata jumlah embrio somatik torpedo terbaik dicapai masing-masing pada konsentrasi kinetin 2 ppm yaitu sebesar 9,3 dan 7,8. Pada Klon ICS 13 respon terbaik untuk rata-rata jumlah embrio somatik torpedo terjadi pada kontrol tetapi tidak berbeda nyata dengan rata-rata jumlah embrio pada berbagai konsentrasi kinetin 2 ppm.

Persentase rata-rata embrio torpedo yang terbentuk pada Tabel 6 menunjukkan bahwa persentase tertinggi dari seluruh klon yang diuji

diperoleh pada klon ICS 13 dan ICS 60 dengan konsentrasi kinetin 0 ppm (100%). Sedangkan rata-rata persentase terendah embrio somatik torpedo adalah 33,0% terjadi pada klon DR 1 konsentrasi kinetin 1 ppm, klon DR 2 konsentrasi kinetin 0 ppm dan klon ICS 13 konsentrasi kinetin 2 ppm. Menurut Winarsih *et al.*(2003), perbedaan respon antar klon yang diuji disebabkan konsentrasi zat pengatur tumbuh pada media inisiasi berpengaruh terhadap jumlah embrio somatik pada multiplikasi.

Alemanno *et al.* (2000) melakukan pengamatan efisiensi dan penyesuaian potensi embriogenik dari faktor genetik. 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 Li *et al.* (1998).

Embriogenesis somatik memiliki kelemahan berupa pembentukan embrioid yang tidak serempak sehingga perkembangan embrio tidak seragam. Fakta dalam penelitian ini, terjadi ketidakseragaman dalam jumlah dan ukuran embrio somatik terbentuk dari satu eksplan dengan klon yang sama dan perkembangan embrio somatik dalam satu eksplan tidak bersamaan (terdapat fase globular, hati maupun torpedo) (Gambar 1).

Pertumbuhan dalam kultur ke arah pembelahan sel dan morfogenesis menggunakan sitokinin yang merupakan turunan adenin. Sitokinin yang dikombinasikan dengan NAA dapat digunakan untuk pembentukan embrioid dari kultur kotiledon embrio kakao (Chantrapradist dan Kamnoon, 1995). Termasuk dalam golongan sitokinin diantaranya Kinetin, BAP, 2iP dan Thidiazuron. Aplikasi auksin saja pada kultur *in vitro* kurang efektif untuk pertumbuhan embrio somatik sedangkan auksin yang dikombinasikan dengan kinetin lebih efektif untuk merangsang pembentukan embrio somatik (Chantrapradist & Kanchanapoom 1995).

Tabel 4. Rata-rata kedirian eksplan membentuk kalus embriogenik (pengamatan hingga 25 MST).

[Kinetin]	Klon			
	DR 1	DR 2	ICS 13	ICS 60
0 ppm	10,0 hi	18,0 bc	9,8 i	15,0 de
1 ppm	17,5 bc	12,3 fgh	12,3 fgh	11,0 hi
2 ppm	14,3 def	10,8 hi	12,3 fgh	16,3 cd
3 ppm	22,5 a	12,3 fgh	11,5 ghi	19,5 b
4 ppm	16,0 cd	15,0 de	16,0 cd	13,5 efg

Keterangan : angka data pada tabel = rata-rata MST, angka pada kolom dan baris dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNJ pada taraf 5%.

Tabel 5. Jumlah embrio somatik fase torpedo (30 MST).

[Kinetin]	Klon			
	DR 1	DR 2	ICS 13	ICS 60
0 ppm	5,0 f	5,5 f	7,3 de	11,3 a
1 ppm	3,0 ghi	2,0 jk	2,8 ghij	2,8 ghij
2 ppm	9,3 b	7,8 cd	6,8 e	8,5 bc
3 ppm	3,5 g	1,8 k	2,3 ijk	2,0 jk
4 ppm	3,3 gh	2,5 hijk	2,5 hijk	2,8 ghij

Keterangan : angka pada kolom dan baris dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNJ pada taraf 5%.

Tabel 6. Persentase embrio somatik jenis torpedo (30 MST).

[Kinetin]	Klon			
	DR 1	DR 2	ICS 13	ICS 60
0 mg/L	75,3 bc	33,0 g	100,0 a	100,0 a
1 mg/L	33,0 g	41,5 fg	50,0 ef	50,0 ef
2 mg/L	41,5 fg	50,0 ef	33,0 g	58,3 de
3 mg/L	83,5 b	67,0 cd	50,0 ef	41,5 fg
4 mg/L	75,3 bc	41,5 fg	75,3 bc	41,5 fg

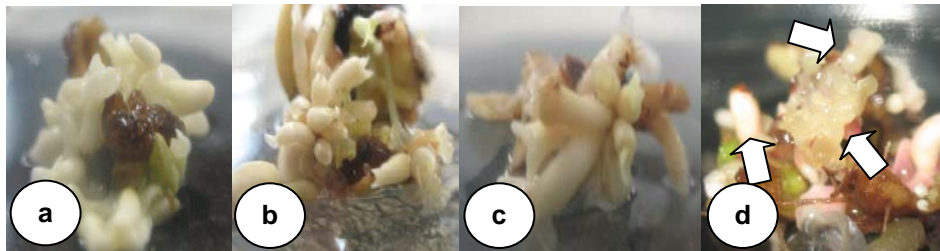
Keterangan : angka pada kolom dan baris dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNJ pada taraf 5%.

Pembentukan akar pada tahap pendewasaan

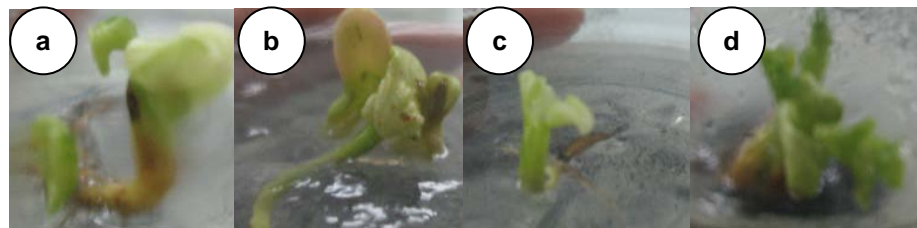
Perkembangan perakaran dan pertunasan dari eksplan sampai dengan minggu ke 36 dari seluruh eksplan yang diakarkan pada klon-klon yang diuji hanya menunjukkan respons berakar, dan belum menunjukkan respons bertunas (Gambar 2).

Klon DR 1 merupakan klon yang cukup responsif terhadap penambahan kinetin. Hal ini tampak dalam hasil rata-rata jumlah dan persentase akar. Pada konsentrasi 2 dan 4 ppm

klon DR 1 mencapai rata-rata jumlah dan persentase akar tertinggi yaitu 3,0 dan 100%. Klon DR 2, pada konsentrasi kinetin 2 ppm memiliki rata-rata jumlah akar tertinggi yaitu 2,3 dengan persentase sebanyak 75,0%. Sedangkan Klon ICS 13 mempunyai rata-rata jumlah akar tertinggi 3,0 pada perlakuan kontrol dengan persentase eksplan berakar dan 100%. Untuk klon ICS 60 rata-rata jumlah akar tertinggi terjadi pada perlakuan kinetin 2 ppm yang menghasilkan jumlah akar rata-rata 3,0 dengan persentase 100% (Tabel 7 & 8).



Gambar 1. Embrio somatik dari klon yang sama dapat menghasilkan jumlah embrio somatik berbeda (a, b, dan c); dalam satu eksplan terdapat embrio fase globular, hati dan torpedo (d).



Gambar 2. Eksplan pada tahap pendewasaan. (a) klon DR 1, (b) klon DR 2, (c) klon ICS 13 dan (d) klon ICS 60.

Tabel 7. Rata-rata jumlah akar per eksplan (36 MST).

[Kinetin]	Klon			
	DR 1	DR 2	ICS 13	ICS 60
0 ppm	1,0 c	0,0 d	3,0 a	1,0 c
1 ppm	1,0 c	0,0 d	2,0 b	0,0 d
2 ppm	3,0 a	2,3 b	1,0 c	3,0 a
3 ppm	1,3 c	1,3 c	0,0 d	0,0 d
4 ppm	3,0 a	0,0 d	0,0 d	1,0 c

Keterangan: angka pada kolom dan baris dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNJ pada taraf 5%.

Tabel 8. Persentase eksplan berakar (36 MST).

[Kinetin]	Klon			
	DR 1	DR 2	ICS 13	ICS 60
0 ppm	33,0 d	0,0 e	100,0 a	33,0 d
1 ppm	33,0 d	0,0 e	66,8 bc	0,0 e
2 ppm	100,0 a	75,0 b	58,3 c	100,0 a
3 ppm	41,5 d	41,5 d	0,0 e	0,0 e
4 ppm	100,0 a	0,0 e	0,0 e	33,0 d

Keterangan: angka pada kolom dan baris dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut uji BNJ pada taraf 5%.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian optimasi regenerasi embrio zigotik beberapa klon kakao (*Theobroma Cacao* L.) dalam media dasar B5 dengan penambahan kinetin dapat diambil kesimpulan bahwa daya regenerasi terbaik terhadap penambahan kinetin ditunjukkan oleh klon DR1 dan konsentrasi kinetin yang paling sesuai untuk regenerasi beberapa klon kakao adalah 2 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Adu-Ampomah Y, Novak FJ, Afza R & Van Duren M. 1992. Meristem Tip Culture of Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Trop. Agric.* **69**: 268-272.
- Alemanno L, Maximova SN, Ferriere N & Guiltinan MJ. 2000. Comparison de Embryogenese Somatique Primaire et Secondaire: Evaluation de L'efficacite et Ontogenese des Embryos Somatiques. *Proceeding of 13th Int. Cocoa Research Conf.* Kota Kinabalu. Sabah, Malaysia.
- Alemanno L, Ramos T, Gargadene A, Andary C & Ferriere N. 2003. Localization and Identification of Phenolic Compounds in *Theobroma cacao* L. Somatic Embryogenesis. *Annals of Botany.* **92**:613-623.
- Alemanno L, Garzon I, Oliver G, Dedieu F, Paulin D, Hauthuille AD, Wapo L & Amores F. 2007. Plant production by somatic embryogenesis from genotypes selected for agronomic traits in Ivory Coast and Ecuador [Poster]. In: 14th International Cocoa Research Conference, 13-18 October 2003, Accra, Ghana. - Montpellier: Cirad, 2003, http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=515850 [17 April 2009].
- Chantrapradist C & Kanchanapoom K. 1995. *Somatic Embryo Formation from Cotyledonary Culture of Theobroma cacao* L. Department of Biology. Faculty of Science. Prince of Songkla University, Thailand.
- Fang JY, Wetten A & Hadley P. 2004. Cryopreservation of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) Somatic Embryos For Long-Term Germplasm Storage. *Plant Science.* **166**: 669-675.
- Fontanel A, Alvarez M, Lopez-Baez O, Labbe G & Petiard V. 2002. Improvement of Somatic Embryogenesis of *Theobroma cacao* L. Centre de Recherche Nestle Tours, France.
- Funek D, Kasran R, Lock TC, Johnsiul L, Mohammed A, Hartney V, Yusof MM, LaMin K & Tong LM. 2007. Biotechnology Research by the Malaysian Cocoa Board: Propagation by somatic embryogenesis. [http://www.koko.gov.my/CocoaBioTech/ING_Workshop\(143-148\).html](http://www.koko.gov.my/CocoaBioTech/ING_Workshop(143-148).html). [17 April 2007].
- Li Z, Traore A, Maximova S & Guiltinan MJ. 1998. *Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Floral Explants of Cocoa (Theobroma cacao L.) using Thidiazuron*. Department of Horticulture. College of Agricultural Sciences. The Pennsylvania State University Park. Pennsylvania. 16802-4200.
- Masseret B, Vachet C, Florin B, Gianforcaro M, Fillodeau A, Brulad E, Bouquet JF, Alvarez M & Broun P. 2008. Propagation of Cocoa (*Theobroma cacao* L.) by Somatic Embryogenesis and Field Performance on The Trees. Nestle R & D Centre, Tours, France. Presented in *Indonesian Cocoa Symposium*. Denpasar (Bali). 28-29 October 2008.
- Mark GJ & Maximova SN. 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.
- Maximova SN, Alemanno L, Young A, Ferriere N, Traore A & Guiltinan MJ. 2002. Efficiency, Genotypic Variability, and Cellular Origin of Primary and Secondary Somatic Embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **38**: 252-259.
- Mayolo GA, Maximova SN, Pishak S & Guiltinan MJ. 2003. Moxalactam as a Counter Selection Antibiotic for Agrobacterium Mediated Transpormation and Its Possitive Effect on *Theobroma cacao* Somatic Embryogenesis. *Plant Science.* **164**: 607-615.
- Ragapadmi P. 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Buletin AgroBio.* **5**(2): 51-58.
- 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.
- Tahardi JS & Mardiana N. 1995. Cocoa Regeneration via Somatic Embryogenesis. *Menara Perkebunan.* **52**: 174-178.
- Traore A, Maximova SN & Guiltinan MJ. 2003. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. Using Somatic Embryo-Derived Plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant:* 1-7.
- Winarsih S & Priyono. 1995. Induksi Tunas Aksiler pada Kakao secara in Vitro. *Pelita Perkebunan.* **11**: 159-167.
- Winarsih S, Santoso D & Wardiyati T. 2002. Embriogenesis Somatik dan Regenerasi dari Eksplan Embrio Zigotik Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Pelita Perkebunan.* **18**(3): 99-108.
- 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.