

Regenerasi Embriogenesis Somatik pada Beberapa Klon Kakao Indonesia dari Eksplan Bunga

Somatic Embryogenesis Regeneration of Several Indonesian Cocoa Clones Using Flower Explant

Sholeh Avivi^{1*}, Adi Prawoto², dan Reny Fauziah Oetami²

¹Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 23 Jember 68121, Indonesia

²Indonesian Coffee and Cocoa Research Institute (ICCRI)
Jl. PB. Sudirman No. 90 Jember, Indonesia

Diterima 16 April 2010/Disetujui 8 Juli 2010

ABSTRACT

This research was aimed to observe the response of different clones and specific organs due to the somatic embryogenesis regeneration. It was arranged in factorial randomized completely design with three replication. The first factor was cocoa clones i.e. ICCRI 01, ICCRI 02, ICCRI 03, ICCRI 04, KW 514, RCC72, and Sca 6. The second factor was flower parts i.e. petal, staminode and anther. Every explant was regenerated on initiation, induction, multiplication and rooting media. Almost all treatments showed high response of embryogenic calli which range 89.5 to 100% at initial stage, but different results were found at the following process of somatic embryogenesis. The experiment showed that each clones and each different part of flower had different response to somatic embryogenesis. The highest response of the explant number resulted from Sca 6 clone, which produce 35.8% embryo with average number of embryo per explant (1.34) followed by RCC 72 (28.4%, averaged 0.7) ICCRI 03 (24.7%, averaged 1.3) ICCRI 04 (18.6%, averaged 0.6). While ICCRI 02 showed the lowest responsive clone. Especially for ICCRI 01, 55.8% explant was rooted and only 1.3% explant producing embryo. The highest response of somatic embryo was resulted from petal.

Keywords: somatic embryogenesis, flower explant, Cocoa

PENDAHULUAN

Indonesia termasuk negara penghasil kakao terbesar ke tiga setelah Pantai Gading dan Ghana, yakni dengan nilai produksi tahunannya mencapai 572 ribu ton. Berdasarkan data dari Direktorat Jenderal Perkebunan, pada tahun 2003 luas areal penanaman kakao telah mencapai 917 ribu ha dan tersebar di seluruh provinsi, kecuali DKI Jakarta (Wahyudi *et al.*, 2008).

Dalam rangka program revitalisasi perkebunan kakao yang rata-rata berumur 25-30 tahun, kekurangan benih dan bibit kakao di Indonesia diperkirakan sebesar 47.7 juta pada tahun 2009 dan 30.4 juta pada tahun 2010 (Rahardjo dan Wahyudi, 2006). Kondisi tersebut menimbulkan masalah dalam penyediaan benih kakao, karena benih kakao termasuk benih rekalsitran dengan daya simpan pendek. Benih rekalsitran dalam penyimpanannya mempunyai kandungan air lebih dari 20%, tidak tahan dikeringkan dan tidak tahan disimpan pada suhu rendah (Pence, 1992; Benson, 2000; Fang *et al.*, 2004). Benih kakao yang dikeluarkan dari buahnya dapat berkecambah dalam waktu 3-4 hari dan

segera kehilangan daya kecambahnya. Di samping daya simpan yang pendek, kekurangan lain dari benih kakao adalah sifat heterogenitas tanaman yang baru diketahui setelah tanaman berumur 4-5 tahun.

Perbanyakan tanaman kakao sampai saat ini paling banyak dilakukan secara generatif (75-90%) melalui benih hibrida F1 (*inter clonal hybrid*). Perbanyakan secara generatif melalui benih relatif lebih mudah tetapi tanaman yang dihasilkan mempunyai sifat yang tidak seragam (Maximova *et al.*, 2002). Perbanyakan secara vegetatif lebih sulit dibandingkan dengan perbanyakan secara generatif, namun tanaman yang dihasilkan lebih seragam. Tanaman kakao yang berasal dari perbanyakan vegetatif (10-25%) pada umumnya diperoleh melalui metode stek, sambungan dan okulasi (*entres*) (Winarsih *et al.*, 2003). Bibit kakao asal perbanyakan vegetatif saat ini belum dapat memenuhi permintaan akan bibit kakao dalam jumlah besar, karena sangat dibatasi oleh jumlah tunas dan cabang yang siap ditek, disambung, dan diokulasi.

Bibit kakao yang dapat menghasilkan tanaman yang sama baiknya dengan induk unggulnya sangat diperlukan. Salah satu alternatif adalah dengan memanfaatkan bibit asal organ vegetatif yang dihasilkan melalui teknik kultur jaringan dengan proses embriogenesis somatik. Teknik

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: avi_vi@yahoo.com

kultur jaringan dapat digunakan untuk menghasilkan bibit kakao dalam jumlah besar dan seragam dalam waktu yang relatif singkat, dan tidak tergantung musim (Ragapadmi, 2002).

Beberapa penelitian kultur jaringan di Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia untuk menghasilkan bibit kakao hasil kultur jaringan melalui proses regenerasi embriogenesis somatik telah dilakukan (Winarsih dan Priyono, 1995; Winarsih *et al.*, 2002; Winarsih *et al.*, 2003). Beberapa peneliti lain juga mengembangkan regenerasi kakao melalui proses embriogenesis somatik (Mayolo *et al.*, 2003; Alemanno *et al.*, 2003; Traore *et al.*, 2003). Teknik embriogenesis somatik juga sudah dimanfaatkan untuk keperluan penyimpanan dalam nitrogen cair dengan teknik kriopreservasi (Fang *et al.*, 2004; Gonzalez dan Engelman, 2006; Wang dan Perl, 2006). Jenis eksplan kakao yang sudah diteliti daya regenerasinya adalah daun muda, nuselus, embriozigotik muda biji kakao dan seluruh bagian-bagian bunga termasuk antera (Sondahl *et al.*, 1993; Alemanno *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Produksi masal bibit kakao klon-klon baru dengan teknik kultur jaringan masih perlu penelitian lebih lanjut.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menghasilkan optimasi regenerasi beberapa klon unggul kakao Indonesia melalui proses induksi embriogenesis somatik (ES).

BAHAN DAN METODE

Penelitian embriogenesis dari organ bunga kakao dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jember, pada bulan Agustus 2007 sampai dengan Maret 2008.

Penelitian disusun menurut Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan 2 faktor, yang diulang 3 kali. Faktor pertama adalah 7 klon kakao yaitu ICCRI 01, ICCRI 02, ICCRI 03, ICCRI 04, KW 514, RCC 72 dan Sca 6. Faktor ke-2 adalah 3 bagian organ bunga yaitu mahkota (petala), staminodia dan antera. Uji perbandingan rata-rata perlakuan digunakan Uji Tukey pada taraf nyata 5%.

Eksplan diperoleh dari Kebun Koleksi Kakao milik Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia. Eksplan diambil dari bunga kakao yang masih kuncup dengan panjang 3-6 mm (umur bunga tidak ditentukan), dipilih kuncup yang belum mekar yang terdiri atas bagian petala, staminodia, dan antera.

Kuncup bunga direndam dalam larutan *Sodium hypochloride* 5% selama sekitar 5 menit sambil sesekali dikocok, kemudian dibilas tiga kali dengan aquadestilata steril. Setelah itu bunga dipisahkan sesuai bagian-bagiannya yaitu mahkota (petala), staminodia dan antera. Eksplan yang sudah disterilisasi selanjutnya diregenerasikan melalui tahapan inisiasi, induksi, multiplikasi, dan pendewasaan.

Eksplan yang telah disterilisasi ditanam dalam media inisiasi berupa media dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962) dengan penambahan 2 mg L⁻¹ 2,4-D, 0,25 mg L⁻¹ Adenin, 30 g L⁻¹ Sukrosa dan 2 g L⁻¹ *phytagel* (Lopez-Baez *et al.*, 1993). Kultur diinkubasi selama 2 minggu dan dilakukan pengamatan terhadap jumlah eksplan berkalus.

Eksplan yang telah berkalus dipindah ke media induksi dengan komposisi media sama dengan media inisiasi, tetapi tanpa zat pengatur tumbuh. Sub kultur dilakukan setiap 2 minggu sekali. Pengamatan dilakukan terhadap eksplan dengan kalus embriogenik dan jumlah embrio per eksplan.

Embrio somatik yang diperoleh selanjutnya diperbanyak di media multiplikasi yaitu media MS dengan penambahan 0,01 mg L⁻¹ NAA, 0,3 mg L⁻¹ 2iP, 1 g L⁻¹ arang aktif (*charcoal*), 40 g L⁻¹ glukosa, dan 3 g L⁻¹ *phytagel* (Tahardi dan Mardiana, 1995). Sub kultur dilakukan setiap 2 minggu sekali. Pada setiap sub kultur dilakukan pengamatan terhadap jumlah eksplan yang menghasilkan embrio dan jumlah embrio somatik per eksplan (fase globular, hati, torpedo, kotiledon).

Embrio yang telah berkecambah kemudian dipindah ke media perakaran untuk memperoleh planlet. Media perakaran terdiri dari media MS yang ditambahkan dengan 10 g L⁻¹ glukosa, 1 g L⁻¹ *charcoal*, dan 3 g L⁻¹ *phytagel*.

Parameter pengamatan meliputi: persentase eksplan berkalus (hari ke 12), persentase eksplan dengan kalus friabel/embriogenik (minggu ke 10), dan persentase eksplan menghasilkan embrio (minggu ke 18). Persentase eksplan membentuk embrio dihitung berdasarkan jumlah eksplan yang dapat menghasilkan embrio dari total eksplan yang dikulturkan, jumlah embrio per eksplan (minggu ke 10, 14, dan 18), jumlah embrio berkecambah dan berakar menjadi planlet (setelah minggu ke 18).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inisiasi Kalus

Pada hari ke 12 semua eksplan menghasilkan kalus dengan kisaran 12,7-100% (Tabel 1). Empat klon dapat mencapai persentase eksplan berkalus hingga 100%, yaitu ICCRI 01, ICCRI 04, KW 514 dan RCC 72. Pada

Tabel 1. Interaksi antara klon dan organ bunga terhadap persentase pembentukan kalus pada hari ke 12

Klon	Persentase pembentukan kalus pada organ bunga (%)		
	Petala	Staminodia	Anthera
ICCRI 01	98.3aA	100.0aA	24.0bB
ICCRI 02	96.3aA	96.3abA	20.0bB
ICCRI 03	98.7aA	83.0cdB	88.0aB
ICCRI 04	100.0aA	94.7abcA	20.3bB
KW 514	100.0aA	92.7bcB	19.3bC
RCC 72	100.0aA	100.0aA	12.7bB
Sca 6	97.0aA	73.0dB	19.0b

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

penelitian Winarsih *et al.* (2003), seminggu setelah dikulturkan terjadi pengkalusan pada eksplan yang diawali dengan pembengkakan petala maupun pemanjangan staminodia 2-3 kali ukuran semula. Hasil pengamatan pada penelitian ini menunjukkan bahwa pada hari ke-4 setelah dikulturkan terjadi pembengkakan pada eksplan petala dan pemanjangan staminodia, bahkan pada eksplan petala, staminodia dan sebagian antera sudah terjadi pengkalusan pada hari ke-6.

Regenerasi Embrio Somatik pada Eksplan

Kalus *friabel* yang terbentuk selanjutnya mengalami pendewasaan (*maturation*) yang dicirikan oleh penambahan volume kalus dan warna kalus yang semula putih kekuningan menjadi kuning krem hingga kecoklatan. Pengamatan awal dilakukan pada minggu ke-10 sesuai pendapat Masseret *et al.* (2008) bahwa embrio somatik primer dapat terbentuk setelah 9 minggu sejak eksplan diinduksi. Analisis varian menunjukkan interaksi klon dan bagian organ bunga menghasilkan perbedaan yang sangat nyata terhadap persentase eksplan yang dapat menghasilkan embrio (Tabel 1).

Tabel 2 menunjukkan eksplan yang menghasilkan embrio terutama dijumpai pada eksplan petala. Staminodia dapat menghasilkan embrio hanya pada 2 klon yaitu ICCRI03 dan ICCRI04. Eksplan antera pada penelitian ini sama sekali tidak menghasilkan embrio hingga pengamatan minggu ke-18. Data pada Tabel 2 juga menunjukkan bahwa terdapat 2 kelompok klon yang mempunyai perbedaan persentase sangat nyata yaitu kelompok kakao lindak (ICCRI 03, ICCRI 04, KW 514, RCC 72, Sca 6) dan kelompok kakao mulia (ICCRI 01 dan ICCRI 02). Dari 7 klon yang diuji, 6 klon dapat menghasilkan embrio, dan dari 6 klon tersebut, 5 klon di antaranya mempunyai efisiensi menghasilkan embrio

Tabel 2. Interaksi antara klon dan bagian organ bunga terhadap persentase eksplan menghasilkan embrio pada minggu ke-18

Klon	Bagian organ bunga		
	Petala	Staminodia	Anthera
ICCRI 01	2.4cA	0bA	0aA
ICCRI 02	0.9ccA	0bA	0aA
ICCRI 03	35.3abA	5.1bB	0aC
ICCRI 04	41.2abA	8.5bB	0aC
KW 514	42.5abA	0abB	0aB
RCC 72	31.2bA	0bB	0aB
Sca 6	52.2aA	0aB	0aB

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

yang berkisar antara 31-52% dari eksplan petala. Urutan dari efisiensi tertinggi pada kelima klon tersebut berturut-turut adalah Sca 6 (52.2%), KW 514 (42.5%), ICCRI 04 (41.2%), ICCRI 03 (35.3%) dan RCC 72 (31.2%).

Tan dan Furtek (2002) yang menguji 30 klon kakao untuk mempelajari responsnya terhadap sumber karbon, media dasar dan zat pengatur tumbuh, menunjukkan variasi dalam persentase kalus menghasilkan embrio berkisar antara 0-18.2%. Hasil ini mengindikasikan bahwa diperlukan optimasi prosedur untuk masing-masing klon agar didapatkan hasil yang lebih baik.

Multiplikasi Embriosomatik

Pada minggu ke-10 (Tabel 3), rata-rata jumlah embrio berkisar antara 0.005 embrio (terendah pada klon ICCRI 01) sampai dengan 0.6 embrio (tertinggi pada klon ICCRI 03). Kisaran kurang dari 1 embrio menunjukkan bahwa tidak semua eksplan menghasilkan embrio. Tabel 3 menunjukkan bahwa ada dua kelompok klon yang mempunyai kisaran berbeda, yaitu antara klon kakao mulia (ICCRI 01 dan ICCRI 02) dan klon kakao lindak (ICCRI 03, ICCRI 04, KW 514, RCC 72 dan Sca 6). Menurut Traore *et al.* (2003), inisiasi embrio primer pada proses embriogenesis somatik memerlukan waktu antara 6-8 bulan, sedangkan pada penelitian ini untuk klon-klon yang responsif, inisiasi embrio somatik sudah dapat diamati mulai minggu ke-10 (umur 2.5 bulan) meskipun dengan persentase yang masih rendah.

Pengamatan pada minggu ke-14 (Tabel 3), menunjukkan terjadi peningkatan rata-rata jumlah embrio pada semua klon. Meskipun demikian, tetap ada kecenderungan mengikuti pola dua kelompok klon seperti pengamatan sebelumnya. Rata-rata tertinggi jumlah embrio dihasilkan oleh klon ICCRI 03 (2.1) dan terendah oleh

Tabel 3. Rata-rata jumlah embrio per eksplan pada 7 klon kakao (data rata-rata dari seluruh bagian organ bunga yang diuji)

Klon	Lama inkubasi		
	10 MST	14 MST	18 MST
ICCRI 01	0.005	0.07 b (13.5) ^{a)}	0.07 b (1) ^{b)}
ICCRI 02	0.009	0.03 b (3.1) ^{a)}	0.03 b (1) ^{b)}
ICCRI 03	0.6	2.1 a (3.4) ^{a)}	2.6 a (1.2) ^{b)}
ICCRI 04	0.2	2.0 a (9.7) ^{a)}	2.5 a (1.27) ^{b)}
KW 514	0.2	1.4 a (6.1) ^{a)}	2.9 a (2.13) ^{b)}
RCC 72	0.2	0.9 a (3.7) ^{a)}	1.2 a (1.34) ^{b)}
SCA 6	0.5	1.0 b (1.9) ^{a)}	1.7 b (1.80) ^{b)}

Keterangan: a) pada kolom yang sama menunjukkan tingkat kelipatan multiplikasi dibanding minggu ke-10.

b) angka di dalam kurung pada kolom yang sama menunjukkan tingkat multiplikasi dibanding minggu ke-14; MST = minggu setelah tanam.

klon ICCRI 02 (0.03). Tingkat multiplikasi dibandingkan pengamatan minggu ke-10, tertinggi pada klon ICCRI 04 (9.7) meskipun dari rata-rata jumlah embrionya masih lebih rendah klon ICCRI 03. Pengamatan pada minggu ke-18 (Tabel 3) mengindikasikan terjadi penurunan tingkat multiplikasi dibanding minggu ke-14. Klon KW 514 menunjukkan tingkat multiplikasi tertinggi (2.1) demikian pula dengan rata-rata jumlah embrio (2.9). Di lain pihak, klon ICCRI 01 dan ICCRI 02 tidak menunjukkan perubahan sejak minggu ke-14 hingga minggu ke-18.

Pendewasaan dan Aklimatisasi

Embrio somatik yang dihasilkan selanjutnya ditumbuhkan pada media perkecambahan dan perakaran agar dapat berkembang menjadi planlet. Embrio somatik yang dikecambahkan adalah embrio yang sudah mencapai fase kotiledon. Meskipun demikian, tidak semua embrio dapat berkembang menjadi kecambah normal, karena sebagian embrio menunjukkan perkembangan yang abnormal (tidak berkembang menjadi tunas, atau menjadi tunas yang tidak mampu membentuk tunas baru disertai dengan akar tidak tumbuh). Hanya embrio yang berkecambah normal yang dapat berkembang menjadi planlet, artinya dapat membentuk tunas dan akar hingga menjadi tanaman sempurna.

Tabel 4 menunjukkan persentase embrio yang dapat berkecambah dan membentuk planlet dari 7 klon kakao yang diteliti. Data pada tabel tersebut menunjukkan bahwa klon Sca 6 menghasilkan persentase kecambah normal yang tertinggi, karena dari 220 embrio somatik fase kotiledon, 157 embrio (71.4%) di antaranya mampu berkecambah dan menghasilkan tunas. Pada kelompok kakao lindak, klon KW 514 menghasilkan persentase kecambah normal

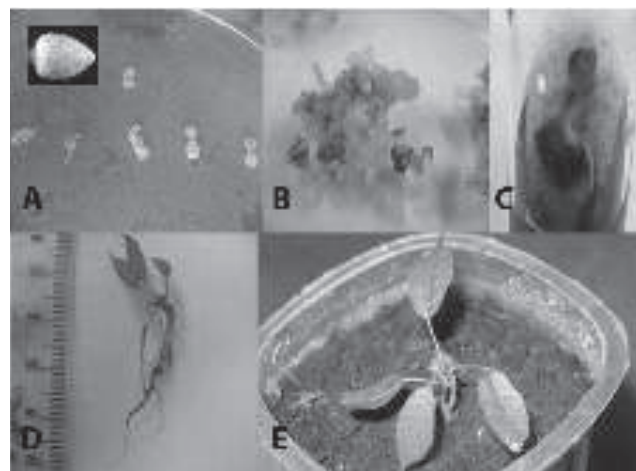
Tabel 4. Jumlah embrio berkecambah dan berakar membentuk planlet pada 7 klon kakao (data rata-rata dari seluruh bagian organ bunga yang diuji)

Klon	Jumlah embrio somatik	Jumlah embrio	
	Fase kotiledon	Kecambah *)	Berakar**)
ICCRI 01	2	0 (0 %)	0 (0 %)
ICCRI 02	0	0 (0 %)	0 (0 %)
ICCRI 03	103	57 (55.3 %)	25 (43.9 %)
ICCRI 04	126	75 (59.5 %)	38 (50.7 %)
KW 514	145	49 (33.8 %)	15 (30.6 %)
RCC 72	82	45 (48.9 %)	30 (66.7 %)
Sca 6	220	157 (71.4 %)	80 (51.0 %)

Keterangan: *) angka dalam persen menunjukkan persentase kecambah terhadap embrio somatik fase kotiledon; **) angka dalam persen menunjukkan persentase planlet terhadap kecambah.

terendah yaitu 33.8%, sedangkan kelompok kakao mulia (ICCRI 01 dan ICCRI 02) pada penelitian ini belum dapat menghasilkan kecambah. Di lain pihak, pengamatan terhadap klon RCC 72 menunjukkan bahwa meskipun persentase kecambah normalnya hanya 48.9% (lebih rendah dari klon Sca 6) tetapi menghasilkan persentase kecambah berakar (planlet) tertinggi yaitu 66.7%, sedangkan klon Sca 6 menempati urutan kedua dengan 51% dari kecambah normalnya yang dapat membentuk planlet. Urutan selanjutnya untuk persentase pembentukan planlet adalah klon ICCRI 04 (50.7%) dan ICCRI 03 (43.9%). Pada kelompok kakao lindak, klon KW 514 selain menghasilkan persentase kecambah normal terendah (33.8%), ternyata juga menghasilkan persentase planlet terendah yaitu 30.6%.

Penelitian Masseret *et al.* (2008) mengindikasikan bahwa faktor genotipe juga menentukan jumlah embrio yang dapat tumbuh normal membentuk planlet. Pengamatan terhadap klon C 20 dan C 22 pada inkubasi 6 minggu menunjukkan 87% embrio dapat berkembang menjadi planlet. Demikian pula dari penelitian ini menunjukkan bahwa klon Sca 6 dari eksplan petala mempunyai persentase jumlah eksplan menghasilkan embrio tertinggi pada minggu ke-18 yaitu 52.2% dan diikuti dengan persentase pembentukan planlet 51% (urutan ke-2). Klon KW 514 meskipun menghasilkan rata-rata embrio per eksplan tertinggi (2.9) sampai minggu ke-18, tetapi persentase kecambah normal dan pembentukan planlet-nya terendah, masing-masing 33.8% dan 30.6%. Kecambah normal yang telah berakar artinya telah berhasil membentuk planlet, dan selanjutnya planlet yang telah membentuk minimal 2 ruas tunas siap untuk dikeluarkan dan diaklimatisasi seperti tampak pada Gambar 1. Dari 30 planlet yang diaklimatisasi (asal eksplan tidak diperhatikan) dapat dihasilkan eksplan yang mampu tumbuh dan menghasilkan tunas baru sebanyak 9 tanaman. Penelitian ini menghasilkan sebanyak 30% tanaman dapat tumbuh baik pada fase aklimatisasi hingga 4 minggu pengamatan.



Gambar 1. Tahap regenerasi dari eksplan petala. A. Bunga kakao (inset) dan petala; B. Embrio somatik; C. Planlet pada fase perakaran; D. Planlet siap aklimatisasi; E. Aklimatisasi planlet

KESIMPULAN

Hasil penelitian menggunakan eksplan bunga beberapa klon kakao tersebut dapat menghasilkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Dari 7 klon yang diuji, 5 klon menghasilkan embrio somatik yaitu ICCRI 03, ICCRI 04, KW 514, RCC 72 dan Sca 6, sedangkan 2 klon di antaranya yaitu ICCRI 01 dan ICCRI 02 sampai pengamatan minggu ke-18 belum menghasilkan embrio somatik. Klon Sca 6 mempunyai persentase jumlah eksplan menghasilkan embrio dan kecambah normal tertinggi (52.2% dan 71.4%) dengan persentase kecambah berakar 51%. Daya regenerasi membentuk embrio paling rendah terjadi pada Klon ICCRI 02.
2. Bagian bunga yang paling responsif daya regenerasinya membentuk embrio adalah petala.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh proyek KKP3T 2007. Terimakasih diucapkan kepada ICCRI atas bantuan klon-klon kakao Indonesia dan tempat penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Alemanno L., M. Berthouly, N. Michaux-Ferriere. 1997. A comparison between *Theobroma cacao* L. zygotic embryogenesis and somatic embryogenesis from floral explants. *In Vitro Cell Dev. Bio. Plant* 33:163-172.
- Alemanno, L., T. Ramos, A. Gargadenc, C. Andary, N. Ferriere. 2003. Localization and identification of phenolic compounds in *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Ann. Bot.* 92:613-623.
- Benson, E.E. 2000. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 36:141-148.
- Fang, J.Y., A. Wetten, P. Hadley. 2004. Cryopreservation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) somatic embryos for long-term germplasm storage. *Plant Sci.* 166:669-675.
- Gonzalez, A.M.T., F. Engelmann. 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *Cryo Letters* 27:155-168.
- Li Z., A. Traore, S. Maximova, M.J. Guiltinan. 1998. Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using Thidiazuron. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 34:2293-299.
- 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.* 316:579-584.
- Masseret, B., C. Vachet, B. Florin, M. Gianforcaro, A. Filloudeau, E. Brulard, J.F. Bouquet, M. Alvarez, P. Broun. 2008. Propagation of Cacao (*Theobroma cacao* L.) by Somatic Embryogenesis and Field Performance of the Trees. Nestle R & D Centre, Tours, France.
- Maximova, S.N., L. Alemanno, A. Young, N. Ferriere, A. Traore, M.J. Guiltinan. 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, G.A., S.N. Maximova, S. Pishak, M.J. Guiltinan. 2003. Moxalactam as a counter-selection antibiotic for agrobacterium-mediated transformation and its positive effects on *Theobroma cacao* L. somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 164:607-615.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:472-497.
- Pence, V.C. 1992. Abscisic acid and the maturation of cacao embryos *in vitro*. *Plant Physiol.* 98:1391-1395.
- Ragapadmi, P. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Bul. AgroBio.* 5:51-58.
- Rahardjo, P., T. Wahyudi. 2006. Dukungan pusat penelitian kopi dan kakao dalam penyediaan benih kakao. Pertemuan Teknis Perbenihan Perkebunan, Direktorat Jendral Perkebunan, Denpasar, Bali. 27-29 Agustus 2006.
- Sondahl, M.R., S. Liu, C. Bellato, A. Bragin. 1993. Cocoa somatic embryogenesis. *Acta Horticulturae* 336:245-248.
- Tahardi, J.S., N. Mardiana. 1995. Cocoa regeneration via somatic embriogenesis. *Menara Perkebunan* 52:174-178.
- Tan C.L., D.B. Furtak. 2002. Development of *in vitro* regeneration system for *Theobroma cacao* L. from mature tissues. *Plant Sci.* 164: 407-412.
- Traore, A., S.N. Maximova, M.J. Guiltinan. 2003. Micropropagation of *Theobroma cacao* L. using somatic embryo-derived plants. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 1:1-7.

- Wahyudi T., R. Panggabean, Pujiyanto. 2008. Panduan Lengkap Kakao, Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Wang, Q., A. Perl. 2006. Cryopreservation of embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. *Methods Mol. Biol.* 318:77-86.
- Winarsih, S., Priyono. 1995. Induksi tunas aksiler pada kakao secara *in vitro*. *Pelita Perkebunan* 11:159-167.
- Winarsih, S., D. Santoso, T. Wardiyati. 2002. Embriogenesis somatik dan regenerasi dari eksplan embrio zigotik kakao (*Theobroma cacao* L.). *Pelita Perkebunan* 18: 99-108.
- Winarsih, S., D. Santoso, T. Wardiyati. 2003. Embriogenesis somatik dan regenerasi tanaman pada kultur *in vitro* organ bunga kakao. *Pelita Perkebunan* 19:1-16.