

REGENERASI TANAMAN KAKAO (*Theobroma cacao L.*) MELALUI EMBRIOGENESIS SOMATIK

REGENERATION OF COCOA (Theobroma cacao L.) THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS

Indah Sulistiyorini dan Cici Tresniawati

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
Jl. Raya Pakuwon – Parungkuda km. 2 Sukabumi, 43357
Telp. (0266) 6542181, Faks. (0266) 6542087
cici_tresniawati@yahoo.com

ABSTRAK

Tanaman kakao (*Theobroma cacao L.*) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang mempunyai nilai ekonomi cukup baik dan peluang pasarnya masih cukup besar. Produktivitas kakao saat ini mengalami penurunan karena tanaman kakao yang ada saat ini umurnya sudah tua dan tidak produktif, serta serangan hama dan penyakit. Bahan tanam kakao dapat diperoleh melalui perbanyakan generatif (benih) dan vegetatif (okulasi, sambungan, *microcutting* dan embriogenesis somatik). Perbanyakan melalui embrio somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif karena mempunyai struktur yang bipolar yaitu mempunyai calon meristem akar dan meristem tunas. Tanaman kakao yang dihasilkan melalui embriogenesis somatik mempunyai performa yang tidak berbeda jauh dari tanaman yang dihasilkan melalui perbanyakan secara konvensional. Dengan metode embriogenesis somatik mempunyai peluang yang cukup besar untuk memproduksi benih unggul kakao dalam skala besar yang tidak tergantung dengan musim dan tidak membutuhkan areal yang luas.

Kata kunci: kakao (*Theobroma cacao L.*), bipolar, embrio somatik, *in vitro*, staminodia.

ABSTRACT

Cocoa (Theobroma cacao L.) is one of estate crops which has high economic value in the market. Current cocoa productivity is declining due to old and unproductive plants, as well as pests and diseases attacks. Planting materials can be obtained through generative propagation (seeds) and vegetative propagation (budding, grafting, microcutting and somatic embryogenesis). Somatic embryogenesis is more favorable than adventitious buds multiplication because the plantlet has bipolar structure, consisting of root meristem and shoot meristem. Cocoa that produced through somatic embryogenesis-propagated plant has performance that is not significantly different from conventionally propagated plants. Somatic embryogenesis has a promising opportunities as an alternative method in producing cocoa seeds in large scale, independent of seasonal change and requires less space, .

Key words: cocoa (Theobroma cacao L.), bipolar, embryo somatic, staminode, and in vitro

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan produsen kakao terbesar ke-3 di dunia dengan produksi 1,64 juta ton dibawah negara Pantai Gading dan Ghana (International Cocoa Organization (ICCO), 2015). Volume ekspor kakao Indonesia tahun 2013 sebesar 414.100 ton dengan nilai 1.053.5 juta US\$, volume tersebut mengalami penurunan dibandingkan dengan volume ekspor pada tahun 2009 yang berkisar 535.240 ton.

Luas areal perkebunan kakao sampai 2013 diperkirakan mencapai 1.736.403 ha (Direktorat Jendral Perkebunan (Ditjenbun), 2014). Produktivitas kakao saat ini mengalami penurunan karena tanaman kakao yang ada saat ini umurnya sudah tua dan tidak produktif (Rubiyono & Siswanto, 2012), oleh karena itu dibutuhkan suatu metode untuk memproduksi bahan tanam berupa klon unggul dalam jumlah yang besar dan waktu yang lebih singkat. Hal ini dapat dilakukan dengan metode somatik

embriogenesis, selain tanaman bersifat sama dengan induknya (*true to type*) metode ini dapat menghasilkan tanaman dengan struktur bipolar dan memiliki perakaran tunggang.

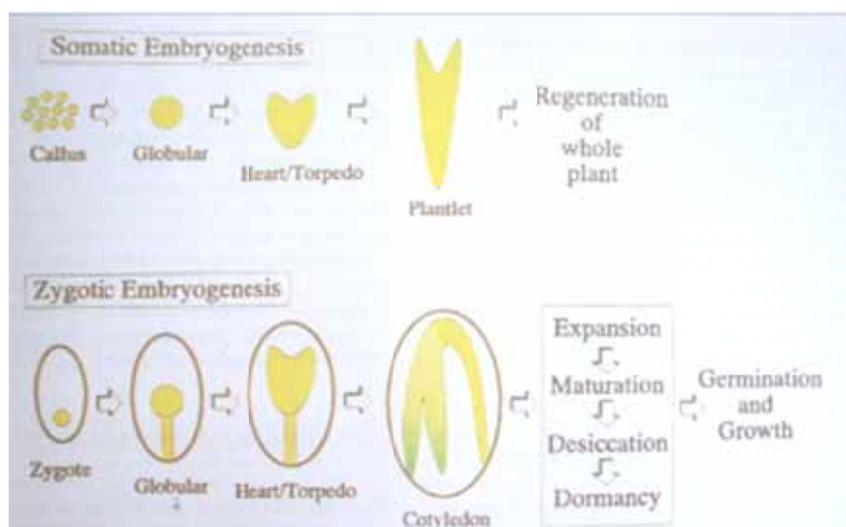
Perbanyakan benih unggul kakao dapat dilakukan secara generatif melalui benih F1 dan secara vegetatif melalui okulasi, sambungan dan setek. Perbanyakan kakao secara generatif relatif lebih mudah namun tanaman yang dihasilkan mempunyai heterogenitas yang tinggi disebabkan sistem serbuk silang yang dimilikinya. Selain itu, benih kakao mempunyai daya simpan pendek karena termasuk benih rekalsitran yang tidak dapat disimpan dengan kadar air rendah (Fang *et al.*, 2004 dalam Avivi, 2011; Maximova *et al.*, 2002). Perbanyakan klonal secara konvensional mempunyai kendala dalam ketersediaan jumlah tunas dan cabang yang siap disetek, disambung dan diokulasi. Perbanyakan secara vegetatif lebih sulit dibandingkan dengan perbanyakan secara generatif, namun tanaman yang dihasilkan lebih seragam.

Salah satu upaya yang dapat ditempuh untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah melalui perbanyakan secara *in vitro* melalui kultur jaringan. Perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embrio somatik. Teknik

embrio somatik banyak dikembangkan untuk menghasilkan bibit dalam jumlah besar, tidak terbatas dan dapat diperoleh dalam waktu yang lebih singkat. Perbanyakan melalui embrio somatik lebih menguntungkan daripada pembentukan tunas adventif karena mempunyai struktur yang bipolar yaitu mempunyai calon meristem akar dan meristem tunas. Tulisan ini bertujuan untuk mengulas perbanyakan bahan tanaman kakao melalui teknologi somatik embriogenesis.

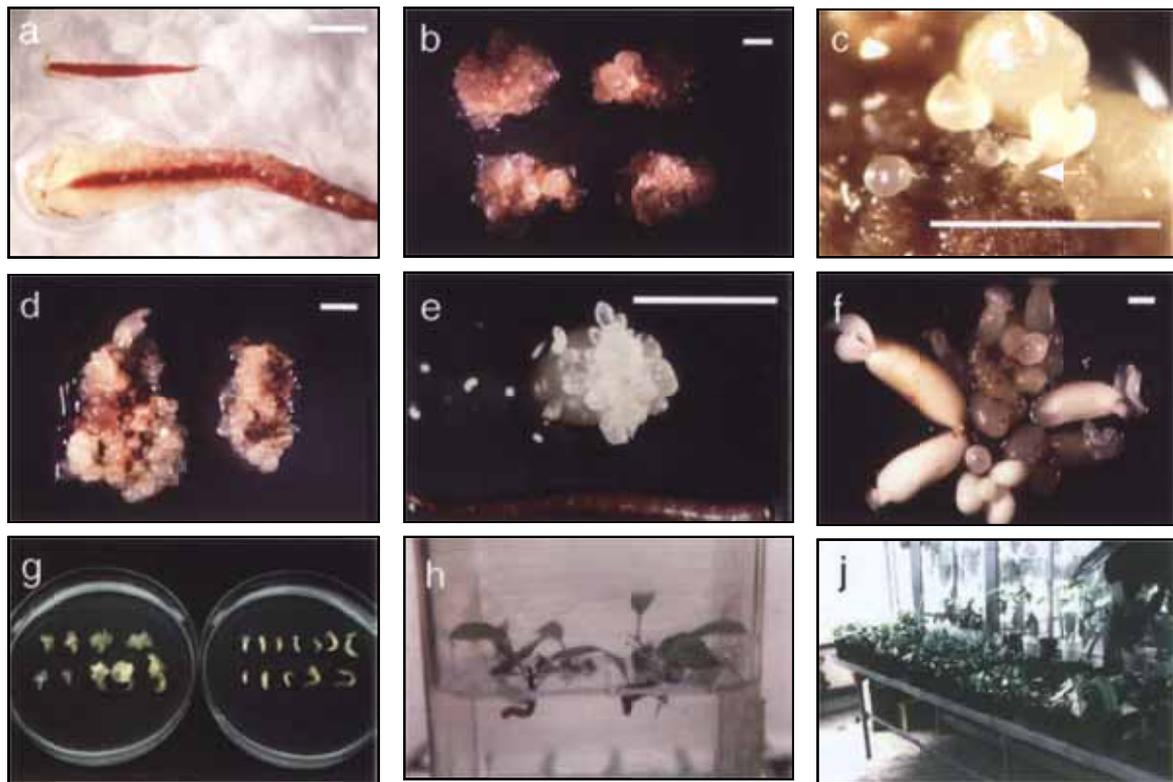
PERBANYAKAN DENGAN EMBRIO SOMATIK

Embrio somatik (ES) adalah suatu proses perkembangan sel somatik membentuk embrio tanpa melalui fusi gamet yang berkembang menjadi tanaman baru. Tahap perkembangan embrio somatik menyerupai embrio zigotik. Tahapan tersebut dimulai dari fase globular, fase hati, fase torpedo dan planlet (Gambar 1). Tahapan embriogenesis somatik dan regenerasi tanaman kakao dari kultur eksplan staminodia terdapat pada Gambar 2. Embriogenesis somatik dapat terbentuk melalui dua jalur yaitu secara langsung maupun tidak langsung (melalui fase kalus) (Purnamaningsih, 2002).



Gambar 1. Tahap perkembangan embrio somatik menyerupai embrio zigotik.

Sumber: Zimmerman, 1993



Gambar 2. Embriogenesis somatik dan regenerasi tanaman kakao dari kultur eksplan staminodia. a. staminodia umur 14 hari setelah dikulturkan, c, d. variasi tahapan perkembangan embrio somatik (bentuk glubolar dan hati), e. embrio somatik sekunder yang dihasilkan dari embrio primer, f. bentuk torpedo embrio somatik. g. embrio somatik yang sudah membentuk kotiledon dan terlambat membentuk kotiledon. h. planlet yang dihasilkan dari embriogenesis somatik. j. planlet yang sudah diaklimatisasi.

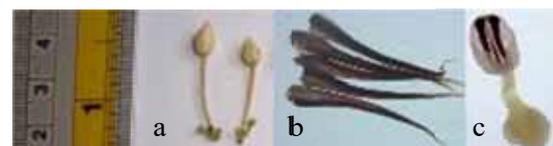
Sumber Li, *et al* (1998).

Penelitian mengenai regenerasi embrio somatik kakao yang berasal dari eksplan daun muda, nuselus, embrio zigotik muda dan seluruh bagian-bagian bunga termasuk antera sudah banyak dilakukan (Sondalh *et al.*, 1993 dan Alemanno *et al.*, 1997 dalam Winarsih *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 2008; Avivi, 2011). Teknik embriogenesis somatik juga sudah dimanfaatkan dalam eliminasi virus pada tanaman kakao (Quainoo *et al.*, 2008).

Sumber Eksplan

Eksplan yang sering digunakan untuk induksi embriogenesis somatik pada kakao adalah bagian bunga kakao (mahkota bunga, staminodia dan kepala putik) (Gambar 3) dan embrio zigotik. Jaringan tersebut banyak digunakan karena menghasilkan fenol dan lendir yang relatif sedikit dibandingkan dengan

bagian tanaman kakao yang lain. Embrio somatik yang berasal dari embrio zigotik kurang bernilai karena biji kakao yang digunakan umumnya berasal dari persilangan terbuka sehingga tidak diketahui identitas genetiknya. Beberapa penelitian banyak memilih menggunakan eksplan dari bagian organ bunga kakao.



Gambar 3. Eksplan yang digunakan dalam ES kakao: kuncup bunga kakao (a), staminodia (b), mahkota bunga (c).

(Sumber: Tresniawati, 2014)

TAHAPAN EMBRIOGENESIS SOMATIK KAKAO

➤ Sterilisasi eksplan

Sterilisasi eksplan merupakan tahapan paling awal untuk menentukan keberhasilan embriogenesis kakao. Kondisi tanaman kakao yang berlendir dan kandungan fenol yang tinggi membutuhkan metode sterilisasi yang tepat agar dapat mengatasi kendala tersebut. Penggunaan eksplan yang bersifat maristematik umumnya memiliki tingkat keberhasilannya lebih tinggi.

Eksplan petal, staminodia dan anther diambil dari bunga yang masih kuncup ukuran 3-6 mm. Kuncup bunga diambil pada pagi hari, selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan menggunakan bahan sterilan antara lain alkohol 70%, larutan *sodium hipoklorit* konsentrasi 2,5% - 5%, dan tween-20. Tahapan berikutnya adalah memisahkan bagian-bagian bunga dengan cara membelah bagian bunga kemudian dipisahkan bagian staminodia, mahkota bunga (petal) dan kepala putik (antera) (Gambar 4).



Gambar 4. Pemisahan staminodia dan mahkota bunga dari kuncup bunga (Sumber: Tresniawati, 2014)

Eksplan yang sudah disterilisasi kemudian diregenerasikan melalui beberapa tahapan yaitu: inisiasi, induksi, multiplikasi dan pematangan (Li *et al.*, 1998; Maximova, 2002; Winarsih *et al.*, 2003; Guiltinan *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2008, Avivi *et al.*, (2010).

➤ Inisiasi kalus

Hasil penelitian Li, *et al.*, (1998) melaporkan bahwa inisiasi staminodia dilakukan pada media PCG (*primary callus growth*). Media tersebut terdiri dari media dasar DKW (*Driver and Kuniyuki walnut*) yang ditambah dengan glutamin 250 mg/l, myo-inositol 2 mg/l, thiamin H-Cl 1 mg/l, *nicotinic acid* 2 mg/l, glukosa 20 g/l, 2,4-D 9 μ M, Thidiazuron 22,7 μ M. Persentase staminodia yang mampu membentuk kalus dari 19 genotipe berkisar antara 1-100%. Genotipe Scavina 6 dari grup forastero menghasilkan persentase kalus paling tinggi. Perbedaan *range* (rentang) yang cukup jauh ini diduga karena pengaruh dari genotipe yang digunakan.

Komposisi media PCG digunakan oleh beberapa peneliti sebagai rujukan untuk media inisiasi pada embriogenesis somatik kakao. Da Silva *et al.*, (2008) menggunakan media PCG untuk inisiasi kalus, dari hasil penelitian melaporkan genotipe TSH 565 menghasilkan persentase kalus embriogenik lebih tinggi dibandingkan genotipe TSH 1188. Traore & Guiltinan (2006) melaporkan dengan komposisi media PCG yang dimodifikasi dari sumber karbon yang berbeda, menunjukkan bahwa penggunaan sumber karbon dari glukosa, fruktosa dan maltosa menghasilkan kalus embriogenik pada enam klon kakao, tetapi penggunaan maltosa dan sorbitol tidak menghasilkan kalus.

Winarsih *et al.*, (2003) dan Avivi *et al.*, (2010) merujuk pada hasil penelitian Lopez-Baez *et al.*, (1993) menggunakan media MS (*Murashige dan Skoog*) sebagai media dasar untuk inisiasi kalus dengan penambahan 2,4-D 2 mg/l, adenine 0,1 – 0,25 mg/l, sukrosa 30 g/l. Persentase kalus yang terbentuk berkisar antara 20-100%. Namun, dari kedua penelitian tersebut terdapat perbedaan respon dalam pembentukan kalus dari bagian organ bunga. Hasil penelitian Winarsih *et al.*, (2003) menunjukkan bagian staminodia mempunyai respons yang lebih baik daripada kepala putik dan mahkota bunga. Hal ini disebabkan karena jaringan tersebut memproduksi fenol dan lendir yang relatif sedikit. Traore & Guiltinan (2006) juga melaporkan bahwa eksplan staminodia

lebih tinggi responnya dalam membentuk kalus daripada eksplan petal. Berbeda dengan hasil penelitian Avivi *et al.*, (2010) yang melaporkan persentase kalus lebih banyak terbentuk pada bagian mahkota bunga (petal) dibandingkan bagian staminodia dan kepala putik. Jenis eksplan yang digunakan diduga berpengaruh terhadap keberhasilan pembentukan embrio somatik kakao.

➤ **Induksi embrio somatik**

Kalus yang sudah terbentuk selanjutnya disubkultur ke media induksi untuk memacu pembentukan embrioid. Induksi kalus embriogenik disebut juga induksi kalus sekunder (*Secondary Callus Growth*). Komposisi media untuk induksi kalus sekunder (SCG) terdiri dari media dasar WPM (*Woody Plant Medium*) ditambah dengan larutan vitamin Gamborg's, glukosa 20 g/l, 2,4-D 9 μ M, kinetin 1,4 μ M, air kelapa 50ml/l dan phytigel 2,2 g/l. Kalus embriogenik yang terbentuk pada lima genotipe kakao pada media SCG berkisar antara 0- 45% (Li *et al.*,1998).

Maximova *et al.*, (2002) melakukan modifikasi media SCG dengan penambahan 2.4-D 2.4 μ M dan BA 1.4 μ M (SCG 2). Media tersebut menghasilkan persentase kalus embriogenik berkisar antara 17-71% pada 8 genotipe kakao (GF 23, GU 143, IFC 5, IFC 705, KER 1, NA 32, NA 79). Hasil penelitian Da Silva *et al.*, (2008) dengan menggunakan media SCG 2 melaporkan bahwa genotipe TSH 565 menghasilkan kalus embriogenik lebih banyak (42%) dibandingkan TSH 1188 (4,3%). Kalus embriogenik dapat juga diinduksi pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh. Dari 7 klon yang diuji, klon Sca 6 menghasilkan kalus embriogenik paling tinggi (52,2%) sedangkan persentase pembentukan embrio somatik paling rendah terdapat pada klon ICCRI 02 (Avivi, *et al.*, (2010). Kalus embriogenik dicirikan dengan struktur kalus yang friabel, berwarna kuning krem hingga kecoklatan, halus, berbentuk nodul dan mengkilat (Winarsih *et al.*, 2003).

Perbedaan respon pembentukan embrio somatik dari beberapa penelitian tersebut diduga karena pengaruh zat pengatur yang digunakan (konsentrasi 2.4-D dan sitokinin

yang berbeda), faktor genotipe dan metode yang digunakan. Purnamaningsih (2002) menyebutkan sumber nitrogen dan zat pengatur tumbuh berperan dalam pembentukan embriogenesis somatik. Nitrogen merupakan komponen utama untuk memacu morfogenesis, inisiasi dan perkembangan embrio somatik. Inisiasi dan pendewasaan embrio somatik membutuhkan keseimbangan yang tepat antara NH_4^+ dan NO_3^- . Konsentrasi NO_3^- yang terlalu tinggi akan menyebabkan pH media meningkat sehingga menghambat pembentukan kalus.

➤ **Regenerasi embrio somatik**

Media untuk regenerasi embrio somatik oleh Li *et al.*, (1998) disebut dengan media *Embryo Development* (ED). Komposisi dari media tersebut menggunakan media dasar DKW ditambah dengan myo-inositol 100 mg/l, 2 mg/l Thiamin-HCl, *Nicotinic Acid* 1 mg/l, Glycin 2 mg/l, sukrosa 30 g/l, glukosa 1 g/l dan phytigel 2 g/l. Persentase kalus embriogenik yang mampu membentuk embrio somatik berkisar antara 1-46%.

Traore & Guiltinan (2006) menggunakan media ED dikombinasikan dengan beberapa sumber karbon untuk regenerasi embrio somatik. Sumber karbon yang digunakan memberikan pengaruh yang berbeda. Sama halnya pada saat inisiasi kalus, penggunaan fruktosa, glukosa dan sukrosa mendukung pembentukan embrio somatik dibandingkan dengan penggunaan maltose dan sorbitol. Penggunaan sukrosa sebagai sumber karbon menghasilkan persentase embrio somatik paling tinggi yaitu 99% dan hanya sukrosa saja yang dapat mendukung pembentukan embrio somatik pada semua genotipe yang digunakan. Da Silva *et al.*, (2008) juga melaporkan sumber karbon yang digunakan berpengaruh terhadap pembentukan embrio somatik, penggunaan sukrosa sebagai sumber karbon menghasilkan jumlah embrio paling tinggi. Niemenak *et al.*, (2008) dengan metode TIS (*Temporary Immersion System*) (Gambar 5) pada tahap induksi embrio somatik mampu menghasilkan embrio somatik dalam jumlah banyak yaitu mencapai 74,7% dari kalus yang mempunyai bobot segar 34g. Embrio yang dihasilkan juga

lebih seragam dan 70% dari embrio yang dihasilkan mampu membentuk planlet (tanaman lengkap).



Gambar 5. Induksi embriogenesis somatik kakao dengan menggunakan metode TIS. (keterangan gambar?)

Sumber : Niemenak *et al.*,(2008)

Hasil penelitian Winarsih *et al.*, (2003) dan Avivi *et al.*, (2010) menyebutkan regenerasi embrio somatik dilakukan pada media MS tanpa zat pengatur. Selanjutnya embrio yang terbentuk diperbanyak dengan melakukan subkultur ke media multiplikasi. Media multiplikasi menggunakan media dasar MS ditambah dengan NAA 0,01 mg/l, 2iP 0,3 mg/l, arang aktif 1g/l, glukosa 40g/l dan phytigel 3 g/l. Persentase eksplan yang membentuk embrio somatik berkisar 24 - 86% dengan jumlah embrio per eksplan antara 1-15. Klon Sca 6 menghasilkan respon paling tinggi dalam membentuk embrio somatik (Winarsih *et al.*, 2003), sedangkan Avivi *et al.*, (2010) melaporkan rata-rata jumlah embrio per eksplan pada 7 klon yang digunakan berkisar antara 1-3, dengan klon ICCRI 04 menghasilkan jumlah embrio per eksplan paling tinggi.

➤ 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. Tidak semua embrio yang dihasilkan mampu berkembang menjadi kecambah normal, karena sebagian embrio menunjukkan perkembangan yang abnormal. Perkembangan abnormal dicirikan dengan tidak terbentuknya tunas, atau tunas yang terbentuk tidak mampu membentuk tunas baru dan tidak terbentuk akar (Avivi *et al.*, 2010). Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan oleh Li *et al.*, (1998) yang melaporkan bahwa embrio somatik yang dihasilkan tidak semuanya berkembang menjadi tanaman normal. Dari hasil penelitian dilaporkan terdapat 2 tipe embrio somatik yang berbeda. Tipe embrio somatik yang pertama penampilan embrio terlihat transparan dan berwarna kekuningan, embrio menghasilkan kotiledon yang berwarna kuning hingga pink. Tipe tersebut tidak dapat membentuk akar dan perkembangan embrio terlihat dorman. Tipe embrio somatik yang kedua adalah embrio tampak berwarna keputih-putihan dengan embrio axis mempunyai kotiledon kecil berwarna putih. Tipe embrio tersebut mampu berkecambah, membentuk akar dan pemanjangan hipokotil.

Winarsih *et al.*, (2003) dan Avivi *et al.*, (2010) menggunakan media dasar MS ditambah dengan glukosa 10 g/l, charcoal 1 g/l dan phytigel 3 g/l untuk pendewasaan embrio somatik. Jumlah embrio somatik yang bertunas berkisar antara 15-46% dan jumlah kecambah abnormal berkisar antara 8-21%, tergantung dari klon yang digunakan. Avivi *et al.*, (2010) melaporkan 71,4% dari total embrio yang dihasilkan (220) mampu berkecambah dan menghasilkan tunas dan yang mampu berakar rata-rata berkisar 0-66%. Kelompok kakao lindak menghasilkan persentase kecambah normal terendah yaitu 33,8%, sedangkan kelompok kakao mulia belum dapat menghasilkan kecambah.

Li *et al.*, (1998) menggunakan media dasar DKW untuk media pendewasaan. Media

tersebut ditambahkan myo-inositol 100mg/l, thiamin-HCl 2 mg/l, glycine 2 mg/l, glukosa 10 g/l, sukrosa 5 g/l, KNO₃ 0,2 g/l dan phytigel 1,7g/l. Persentase embrio yang dapat membentuk tunas adalah 73% dan persentase membentuk akar sebesar 95%. Hasil penelitian Traore dan Guiltinan (2006) menyebutkan embrio somatik yang dihasilkan rata-rata membentuk tunas berkisar antara 20-66% pada media pendewasaan yang mengandung glukosa. Sedangkan pada media fruktosa, sukrosa dan maltose menghasilkan kotiledon yang abnormal. Sedangkan pembentukan akar dilaporkan tidak dipengaruhi oleh sumber karbon yang digunakan. Persentase akar yang terbentuk berkisar antara 17-77%. Penelitian Masseret (2008) dalam Avivi *et al.*, (2010) mengindikasikan bahwa faktor genotipe menentukan jumlah embrio yang dapat tumbuh normal membentuk planlet.

Tahap terakhir dari embriogenesis somatik adalah tahap aklimatisasi. Planlet dari embrio somatik yang sudah memiliki bagian lengkap (daun dan akar) siap untuk diaklimatisasi. Tahap tersebut juga berpengaruh terhadap keberhasilan dari teknik embriogenesis somatik, karena tahapan tersebut merupakan tahapan transisi dari tanaman kakao yang berasal dari kultur untuk dipindahkan ke lapang. Kelembaban udara harus tetap dijaga. Planlet yang siap dikalimatisasi adalah planlet yang mempunyai panjang akar kurang lebih 3 cm dan membentuk minimal 3 ruas. aklimatisasi menggunakan tanah yang sudah disterilkan. Tanaman baru dapat dipindahkan ke lapang sekitar umur 2 bulan setelah aklimatisasi.

Maximova *et al.*, (2008) melaporkan tanaman kakao yang dihasilkan melalui embriogenesis somatik mempunyai performa yang tidak berbeda jauh dari tanaman yang dihasilkan melalui perbanyakan secara konvensional. Dengan metode embriogenesis somatik mempunyai peluang yang cukup besar untuk memproduksi benih unggul kakao dalam skala besar yang tidak tergantung dengan musim dan tidak membutuhkan areal yang luas.

PENUTUP

Keberhasilan regenerasi tanaman kakao melalui embriogenesis somatik dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain genotipe, bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan, komposisi media mulai media dasar, konsentrasi zat pengatur tumbuh, konsentrasi vitamin dan sumber karbon. Genotipe yang berbeda memberikan respons yang berbeda pula dalam pembentukan embrio somatik. Media dasar yang digunakan pada tahapan embriogenesis terdiri dari media MS, DKW dan WPM. Bagian bunga sebagai eksplan dan responsif membentuk embrio somatik adalah bagian petal dan staminodia. Zat pengatur tumbuh yang digunakan adalah 2,4-D, 2iP, Thidiazuron, kinetin dan BA. Sumber karbon yang mampu mendukung perkembangan embrio somatik secara umum adalah glukosa dan fruktosa

DAFTAR PUSTAKA

- Avivi, S. 2011. Regenerasi embrio zigot kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan penambahan kinetin pada media B5. *Jurnal Ilmu Dasar* 12(2), 132-139.
- Avivi, S., Prawoto, A., & Oetami, F. 2010. Regenerasi embryogenesis somatic pada beberapa klon kakao Indonesia dari eksplan bunga. *J. Agron. Indonesia* 38(2), 138-143.
- Da Silva, T. R., Cardoso, L. C., Cerquerira, F.A., De Mattos, J. C. C., Gilberto, M. C.C. 2008. Somatic embryogenesis and plant regeneration in elite clones of theobroma cacao. *Pesq. Agropec. Bras, brasilia.*, 43(10),1433-1436.
- Direktorat Jenderal Perkebunan [Ditjenbun]. 2014. *Statistik Perkebunan: Kakao*. Direktorat Jenderal Perkebunan, Kementerian Pertanian, Jakarta.
- Guiltinan, M. J., Li, Z., Traore., A & Maximova, S. N. 2001. Methods and tissue culture media for inducing somatic embryogenesis, agrobacterium-mediated transformatiaon and efficient regeneration of cacao plants. Patent No: US

- 6.197.587 BI. Date of patent Mar. 6, 2001.
- International Cocoa Organization [ICCO]. 2015. ICCO quarterly bulletin of cocoa statistics, Vol XLI no 3 , Cocoa year 2014/2015. Retrived from http://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/30-related-documents/46-statistics-production.html (tanggal akses)
- Li, Z., Traore, A., Maximova., S. N., & 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.
- Lopez-Baez O., H. Bollon, A. B. Eskes, & V. Petiard. 1993. Embryogenesis somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L., a partir de pieces florales. *CR Acad. Sci.* 316, 579-584.
- Maximova, S. N., Young, A., Pishak, S., & Gultinan, M. J. 2008. Field performance of theobroma cacao L. plants propagated via somatic embryogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant.*, 44,487-493.
- Maximova, S. N., Alemanno, L., Young, A., Ferriera, N., Traore, A., & Gultinan, M. J. 2002. Efficiency, genotypic variability and cellular origin of primary and secondary somatic embryogenesis of *Theobroma cacao* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Plant*:252-259.
- Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Ndoumou, D. O., & Lieberei, R. 2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant cell reports*, 27,667-676
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embryogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin Agrobio.* 5(2), 51-58.
- Quainoo, A. K., Wetten, A. C., & Allainguillaume. 2008. The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cocoa swollen shoot virus from infected cocoa trees. *Journal of Virological Methods*, 149, 91-96.
- Rubiyo & Siswanto. 2012. Peningkatan produksi dan pengembangan kakao (*Theobroma cacao* L.) di Indonesia. *Buletin Riset Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri* 3(1),33-48.
- Traore, A. & Gultinan, M. J. 2006. Effect of carbon source and explants type on somatic embryogenesis of four cacao genotype. *Hort science.* 41(3), 756-758.
- Winarsih, S., Santoso, D., & Wardiyati, T. 2003. Embriogenesis Somatik dan Regenerasi Tanaman Pada Kultur *In Vitro* Organ Bunga Kakao. *Pelita Perkebunan*, 19(1),1-16.
- Zimmerman, J. L., 1993. Somatic embryogenesis: a model for hairy development in higher plants. *The Plant Cell* 5, 1411-1423.