

Jurnal
**TANAMAN INDUSTRI
DAN PENYEGAR**
Journal of Industrial and Beverage Crops
Volume 7, Nomor 1, Maret 2020

**PENINGKATAN EFISIENSI MEDIA PEMBENTUKAN EMBRIO SOMATIK KAKAO
MELALUI PENGGUNAAN GULA PASIR**

***INCREASED EFFICIENCY OF CACAO SOMATIC EMBRYO DEVELOPMENT MEDIUM USING
GRANULATED SUGAR***

* Nur Ajjah¹⁾, Sri Hartati²⁾

¹⁾ **Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar**

Jalan Raya Pakuwon Km 2, Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia

²⁾ **Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan**

Jl. Tentara Pelajar No. 1, Kampus Penelitian Pertanian Cimanggu, Bogor, Jawa Barat, Indonesia

* jjah_ridwan@yahoo.co.id

(Tanggal diterima: 4 November 2019, direvisi: 19 Maret 2020, disetujui terbit: 30 Maret 2020)

ABSTRAK

Ketersediaan metode kultur jaringan yang murah dan efisien sangat diperlukan di dalam pengembangan metode perbanyakan massal. Efisiensi metode dapat diperoleh melalui penggunaan komponen media yang lebih murah seperti gula pasir. Penelitian bertujuan untuk mengetahui efisiensi penggunaan gula pasir di dalam media pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik dan pengaruhnya terhadap pembentukan embrio somatik kakao. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengembangan Benih Unggul Balitbangtan, Cimanggu Bogor, pada bulan Maret – Oktober 2016. Pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik dilakukan di dalam media DKW tanpa zat pengatur tumbuh. Perlakuan yang diuji adalah jenis sumber karbon di dalam media (sukrosa *grade* laboratorium; campuran sukrosa dan gula pasir dengan perbandingan 3:1, 2:2 dan 1:3; gula pasir) dan genotipe kakao (Sca 6 dan ICCRI 4). Penelitian menggunakan rancangan acak kelompok faktorial 2 faktor dengan 8 ulangan, dan setiap unit percobaan terdiri dari 10 eksplan. Hasil penelitian menunjukkan jenis sumber karbon dan genotipe memberikan pengaruh yang nyata terhadap pembentukan embrio somatik kakao, sedangkan pengaruh interaksinya tidak nyata. Penggunaan gula pasir 30 g/l menghasilkan rata-rata persentase pembentukan embrio somatik 35,3% dan jumlah embrio somatik per eksplan 3,5, tidak berbeda nyata dengan sukrosa 30 g/l (31,1% dan 4,1), sedangkan campuran sukrosa dan gula pasir menghasilkan rata-rata persentase pembentukan embrio somatik dan jumlah embrio somatik paling rendah (berturut-turut 20,3%, 18,8%, 17,8% dan 1,5; 2,2; 2,8). Metode embriogenesis somatik kakao yang lebih murah telah berhasil dikembangkan dengan capaian efisiensi sebesar 98,8% per liter media.

Kata kunci: Eksplan; genotipe; kalus; kultur jaringan; murah; sukrosa; sumber karbon

ABSTRACT

Availability of inexpensive and efficient tissue culture methods is needed in the development of mass propagation methods. The efficiency can be obtained through the use of low cost media components such as granulated sugar. The study aimed to determine the efficiency of cacao somatic embryo development medium using granulated sugar and its effect on somatic embryo formation. The study was conducted at Tissue Culture Laboratory for Superior Seed Development, IAARD, Bogor, from March to October 2016. Formation and maturation of somatic embryos was conducted using DKW medium without growth regulators. The treatments tested were carbon sources in the media (laboratory grade sucrose; a mixture of sucrose and granulated sugar with a ratio of 3:1, 2:2 and 1:3; granulated sugar) and cacao genotypes (Sca 6 and ICCRI 4). The study used in a randomized

complete block design in factorial 2 factors with 8 replications, which consisted of 10 explants per experimental unit. The results showed that carbon sources and genotypes significantly affected somatic embryos formation, whereas the interaction effect was not significant. The use of granulated sugar 30 g/l produced approximately 35.3% of somatic embryo formation and 3.5 somatic embryos per explant, which is not significantly different from sucrose 30 g/l (31.1% and 4.1), whereas the mixture of sucrose and granulated sugar produced the lowest average percentage of somatic embryo formation and the number of somatic embryos per explant (20.3%, 18.8%, 17.8% and 1.5; 2.2; 2.8 respectively). The low-cost somatic embryogenesis method was successfully developed with an efficiency of 98.8% per liter of media.

Keywords: Carbon source; callus; explant; genotype; low-cost; sucrose; tissue culture

PENDAHULUAN

Metode perbanyakan melalui kultur jaringan telah dikembangkan pada banyak spesies tanaman, termasuk pada kakao. Keuntungan dari penggunaan kultur jaringan adalah laju multiplikasi yang tinggi sehingga sangat sesuai untuk perbanyakan genotipe secara cepat. Namun demikian, perbanyakan melalui kultur jaringan masih dihadapkan pada keterbatasan biaya produksi yang mahal (Sharm, Singh, & Sharma, 2013). Biaya yang mahal ini disebabkan penggunaan bahan kimia seperti sumber karbon, bahan pemat, tambahan bahan organik dan anorganik serta zat pengatur tumbuh (ZPT) di dalam media (Kadam, Chhatre, Lavale, & Shinde, 2018).

Peningkatan efisiensi pada kultur jaringan antara lain dapat dilakukan melalui pemilihan kultivar dan eksplan yang respon serta optimasi media untuk setiap genotipe. Optimasi media dapat dilakukan melalui pemilihan media dasar dan vitamin, pemilihan sumber karbon serta kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sesuai (Armas, Pogrebnyak, & Raskin, 2017). Sumber karbon di dalam media kultur jaringan sangat berpengaruh terhadap embriogenesis somatik dan efisiensi regenerasi tanaman (Khan, Ahmed, Shahzadi, & Maroof Shah, 2015). Hasil penelitian menunjukkan jenis dan konsentrasi sumber karbon (gula) pada media pendewasaan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik jeruk (Widoretno, Indriyani, & Martasari, 2017) dan *Pinus brutia* TEN (Yildirim, 2005). Konsentrasi gula juga berpengaruh terhadap pembentukan planlet dari embrio somatik tanaman asparagus (Mamiya dan Sakamoto 2000) dan pembentukan kalus tanaman kapas (Michel, Hilaire, Mongomaké, Nguessan, & Justin, 2008).

Sukrosa sangat umum digunakan sebagai sumber karbon di dalam sebagian besar protokol kultur jaringan tanaman karena mudah diasimilasi sehingga mampu menyediakan energi secara cepat. Beberapa kelebihan sukrosa adalah berperan sebagai *transport molecule* di dalam sistem tanaman, mudah larut di dalam air, memiliki muatan listrik netral serta tidak memiliki efek inhibitor terhadap sebagian besar proses biokimia (Smith, 1995). Keberadaan sukrosa di dalam

media pendewasaan embrio somatik tanaman *black spruce* (*Picea mariana* (Mill.) B.S.E) selain berperan sebagai sumber energi juga berperan sebagai pengatur tekanan osmotik (Tremblay & Tremblay, 1995). Sukrosa digunakan di dalam media untuk menginduksi pembentukan dan pendewasaan embrio somatik kakao (Li *et al.*, 1998; Ajijah *et al.*, 2016). Sukrosa juga mampu meningkatkan perakaran pada embrio somatik *Charantus roseus* (Dipti, Fatima & Mujib 2014), sebagai sumber karbon yang terbaik untuk embriogenesis somatik *Asparagus officinale* (Yang, Cheng, & Kamada, 2000) dan mampu menginduksi pembentukan embrio somatik pada wortel (*Daucus carota* L.) (Satoh, Ooka, Wakai, Takahar, & Yamamoto, 2000).

Sukrosa *grade* laboratorium dilaporkan efektif untuk menginduksi embriogenesis somatik dan regenerasi *in vitro* pada banyak tanaman, namun terkendala oleh harga yang mahal sehingga diperlukan alternatif sumber karbon yang dapat menggantikan fungsi sukrosa namun memiliki harga yang lebih murah, salah satunya adalah gula pasir/gula putih untuk konsumsi. Menurut Demo *et al* (2008), penggunaan sukrosa mencapai 34% dari total biaya produksi. Penggantian sukrosa *grade* laboratorium dengan gula pasir atau gula konsumsi dapat menghemat biaya produksi sebesar 78-87% (Prakash *et al.*, 2004). Penggantian sukrosa dengan gula konsumsi di dalam media kultur jaringan antara lain telah dilaporkan pada kultur jaringan tanaman tebu (Khan, Dahot, & Khatri, 2006), kentang (Demo *et al.*, 2008; Kadam *et al.*, 2018; Ozkaynak *et al.*, 2016) dan pisang dengan capaian efisiensi berkisar 95-97% (Kadam *et al.*, 2018; Saraswathi *et al.*, 2016).

Setiap tahapan SE kakao memiliki kebutuhan komposisi media dan sumber karbon yang berbeda. Pada tahapan induksi kalus, sumber karbon yang digunakan adalah glukosa, sedangkan pada tahapan pembentukan dan pendewasaan embrio somatik digunakan sukrosa (Li *et al.*, 1998; Ajijah *et al.*, 2016). Tahapan pembentukan dan pendewasaan embrio somatik kakao menggunakan media yang sama yaitu media DKW tanpa zat pengatur tumbuh. Tahapan ini merupakan tahapan yang paling banyak memerlukan media dan sukrosa karena berlangsung lama, sekitar 20

minggu atau lebih dengan subkultur setiap 2-3 minggu dan memerlukan media dengan kandungan sukrosa 30 g/l. Oleh karena itu penggantian sukrosa *grade* laboratorium dengan gula pasir pada tahapan ini diharapkan dapat meningkatkan efisiensi di dalam penyediaan media SE kakao secara signifikan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui efisiensi media pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik melalui penggunaan gula pasir dan pengaruhnya terhadap pembentukan embrio somatik kakao.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Unit Pengembangan Benih Unggul Balitbangtan, Cimanggu Bogor, pada bulan Maret sampai dengan Oktober 2016.

Bahan Tanaman dan Induksi Pembentukan Kalus

Bahan tanaman yang digunakan adalah kalus yang diinduksi dari mahkota bunga kakao klon Sca 6 dan ICCRI 4 koleksi Laboratorium Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Balitbangtan, Cimanggu Bogor.

Kalus diinduksi pada media induksi kalus primer (*primary callus induction*) selama 14 hari. Media yang digunakan untuk induksi kalus primer terdiri dari media dasar DKW dengan penambahan glutamin 250 mg/l, glukosa 20 g/l, pematid phytagel 2 g/l, serta zat pengatur tumbuh (ZPT) dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 9 μ M dan kinetin 1,16 μ M. Selanjutnya, kalus disubkultur pada media induksi kalus sekunder (*secondary callus growth*) selama 14 hari. Media induksi kalus sekunder terdiri dari media dasar WPM dengan penambahan air kelapa 50 ml/l, glukosa 20 g/l, pematid phytagel 2,2 g/l, 2,4-D 9 μ M dan kinetin 1,16 μ M (Ajijah, 2016; Ajijah *et al.*, 2016).

Induksi Pembentukan Embrio Somatik

Induksi pembentukan embrio somatik kakao dilakukan setelah kalus disubkultur pada media induksi kalus sekunder selama 14 hari. Kalus dipindahkan ke dalam media pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik yang terdiri dari media dasar DKW tanpa ZPT dengan penggunaan sukrosa *grade* laboratorium (Sigma S5391) atau gula pasir curah sebagai sumber karbon sesuai perlakuan (Tabel 1). Selanjutnya, kalus disubkultur setiap 3 minggu ke dalam

media yang sama sampai terbentuk embrio somatik. Kultur diinkubasi pada suhu 25°C dalam keadaan gelap.

Percobaan disusun menggunakan rancangan lingkungan acak kelompok dengan rancangan perlakuan faktorial dua faktor. Faktor pertama adalah jenis sumber karbon di dalam media (Tabel 1) dan faktor kedua adalah genotipe (Sca 6 dan ICCRI 4). Pengelompokan didasarkan pada perbedaan tanggal tanam.

Tabel 1. Komposisi perlakuan sukrosa dan gula pasir pada media pembentukan dan pendewasaan embrio somatik kakao

Table 1. Composition of sucrose and sugar treatments in the formation and maturation media of cacao somatic embryos

Kode media	Komposisi sukrosa dan gula pasir
A.	DKW + Sukrosa 30.0 g/l
B.	DKW + Sukrosa 22.5 g/l + Gula Pasir 7.5 g/l
C.	DKW + Sukrosa 15.0 g/l + Gula Pasir 15.0 g/l
D.	DKW + Sukrosa 7.5 g/l + Gula Pasir 22.5 g/l
E.	DKW + Gula Pasir 30.0 g/l

Pengamatan dan Analisis Data

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 15; 18 dan 21 minggu setelah kultur (MSK). Data yang diperoleh dianalisis ragam dan uji Duncan pada taraf $\alpha = 0,05$ menggunakan program SPSS Statistics versi 20.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Analisis Ragam

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis sumber karbon di dalam media pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik memberikan pengaruh yang nyata terhadap rata-rata persentase pembentukan embrio somatik (15, 18, dan 21 MSK) dan jumlah embrio somatik kakao per eksplan (15 dan 18 MSK). Pengaruh genotipe nyata pada semua peubah yang diamati, sedangkan pengaruh interaksi tidak nyata pada semua peubah yang diamati (Tabel 2). Tidak adanya interaksi menunjukkan bahwa jenis sumber karbon dan genotipe tidak saling mempengaruhi pada pembentukan embrio somatik kakao.

Tabel 2. Hasil analisis ragam pengaruh jenis sumber karbon (M) dan genotipe (G) terhadap pembentukan embrio somatik kakao
Table 2. Result of analysis of variance the effect of carbon source types (M) and genotypes(G) on the formation of cacao somatic embryos

Sumber keragaman	Persentase pembentukan embrio somatik			Jumlah embrio somatik per eksplan		
	15 MST	18 MST	21 MST	15 MST	18 MST	21 MST
..... nilai peluang (p)						
Jenis sumber karbon dalam media (M)	0,027*	0,028*	0,031*	0,001**	0,049*	0,071
Genotipe (G)	0,000**	0,000**	0,000**	0,000**	0,001**	0,030*
M x G	0,086	0,067	0,071	0,175	0,213	0,205
Kelompok	0,799	0,690	0,641	0,276	0,694	0,783

Keterangan: * dan ** masing-masing nyata pada taraf 5% ($p < 0,05$) dan 1% ($p < 0,01$)

Notes : * and ** significant at 5% ($p < 0.05$) and 1% ($p < 0.01$) level, respectively

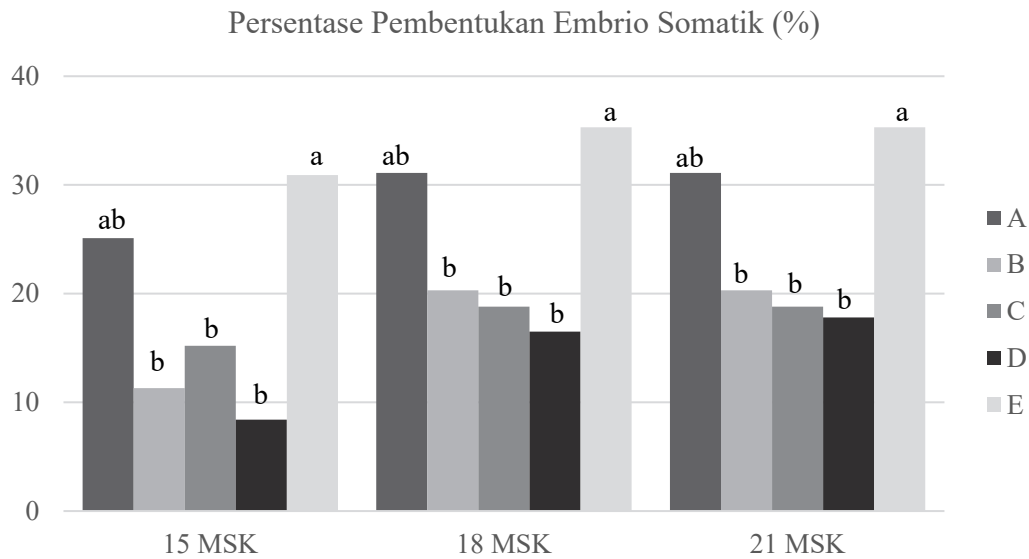
Pengaruh Jenis Sumber Karbon dalam Media

Hasil penelitian menunjukkan penggunaan gula pasir 30 g/l menghasilkan rata-rata persentase pembentukan embrio somatik dan rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan yang tidak berbeda nyata dengan penggunaan sukrosa 30 g/l pada semua tahapan umur kultur yang diamati, bahkan cenderung lebih tinggi untuk peubah rata-rata persentase pembentukan embrio somatik (Gambar 1 dan 2). Hasil yang diperoleh sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa penggunaan 40 g/l gula putih menghasilkan bobot segar kultur tanaman kentang yang lebih tinggi dibandingkan 30 g/l sukrosa dan jumlah buku per tanaman yang tidak berbeda nyata pada penggunaan pematid guar gum 20 g/l (Ozkaynak *et al.*, 2016). Hasil penelitian Demo *et al.* (2008b) juga menunjukkan penggunaan sukrosa dan gula putih 0.3% (w/v) memberikan hasil yang tidak berbeda nyata terhadap persentase hidup dan rata-rata jumlah buku per tanaman pada mikropogasi beberapa varietas kentang. Demikian juga hasil penelitian Placide *et al.* (2012) menunjukkan penggunaan 15 g/l sukrosa dan 15 g/l gula putih tidak menghasilkan perbedaan pada bobot segar planlet pisang. Penggantian sukrosa dengan gula putih pada konsentrasi yang sama juga tidak menghasilkan perbedaan tingkat multiplikasi pada mikropogasi tanaman pisang (Sharm *et al.*, 2013). Tidak adanya perbedaan pengaruh yang signifikan antara penggunaan sukrosa dengan gula putih (gula pasir) kemungkinan karena sukrosa memiliki komposisi kimia yang hampir sama dengan gula putih, hanya tingkat kemurniannya yang berbeda, yaitu 96%–97% sukrosa pada gula putih dan 99.98% pada sukrosa *grade*

laboratorium (Tyagi, Agrawal, Mahalakshmi, Hussain, & Tyagi, 2007).

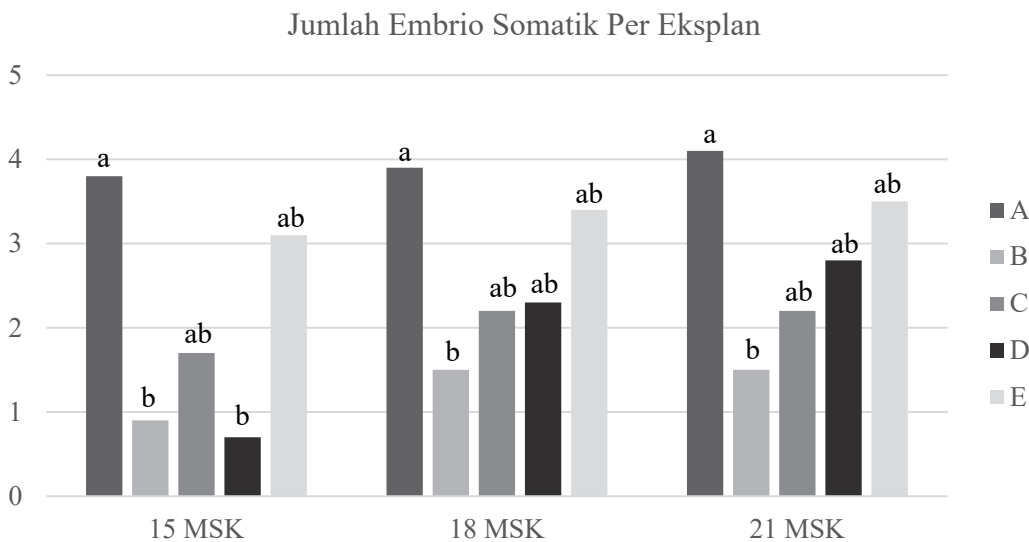
Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa penggunaan sukrosa 30 g/l atau gula pasir 30g/l secara tunggal cenderung menghasilkan rata-rata persentase pembentukan embrio dan jumlah embrio per eksplan yang lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan campuran sukrosa dan gula pasir pada berbagai perbandingan (sukrosa 22,5 g/l + gula pasir 7,5 g/l, sukrosa 15 g/l + gula pasir 15 g/l dan sukrosa 7,5 g/l + gula pasir 22,5 g/) (Gambar 1 dan 2). Rendahnya pembentukan embrio somatik pada media yang menggunakan campuran sukrosa dan gula pasir kemungkinan disebabkan oleh perbedaan tekanan osmotik di dalam media. Penambahan sukrosa di dalam media selain berfungsi sebagai sumber karbon juga berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik di dalam media (Buah *et al.* 2000) dan berpengaruh terhadap pembentukan embrio somatik (Satoh *et al.* 2000).

Beberapa jenis gula atau sumber karbon (energi alternatif) dapat digunakan di dalam kultur jaringan selain sukrosa. Sirup kurma dilaporkan dapat digunakan untuk menggantikan sukrosa di dalam media kultur embriogenesis somatik tanaman kurma (Alkhateeb, 2008), jus tebu pada multiplikasi tunas nilam (Swamy, Sudipta, Balasubramanya, & Anuradha, 2010) serta *brown sugar* pada multiplikasi *protocorm like body* (PLB) *Dendrobium* (Ramart, Puchooa, & Khoiratty, 2010) dan propagasi *in vitro* tanaman kentang (Ozkaynak *et al.*, 2016). Pada penelitian ini, gula pasir atau gula konsumsi dapat digunakan untuk menggantikan sukrosa *grade* laboratorium di dalam media pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik kakao.



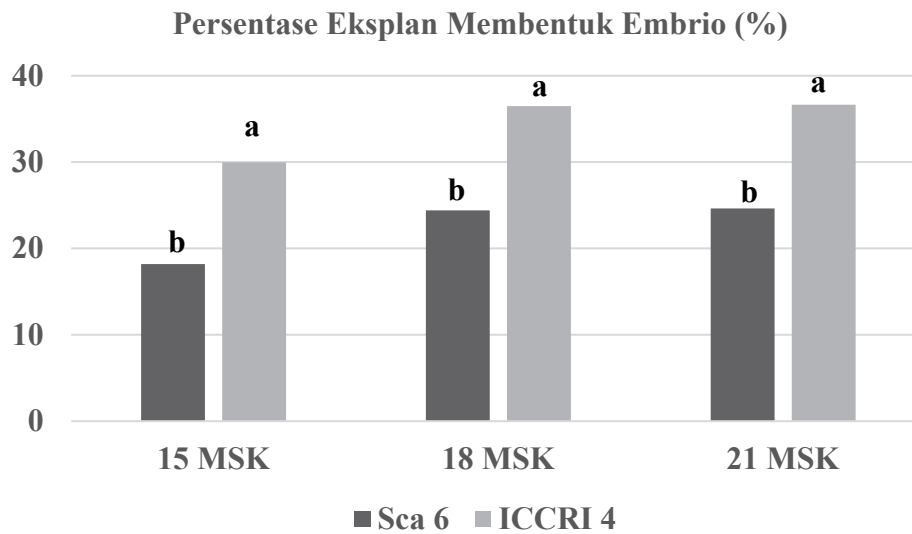
Gambar 1. Rata-rata persentase pembentukan embrio somatik kakao pada penggunaan sukrosa dan gula pasir pada umur 15, 18 dan 21 minggu setelah kultur (MSK). Huruf yang sama pada umur kultur yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf α 5%. A = DKW + Sukrosa 30,0 g/l; B = DKW + Sukrosa 22,5 g/l + Gula Pasir 7,5 g/l; C = DKW + Sukrosa 15,0 g/l + Gula Pasir 15,0 g/l; D = DKW + Sukrosa 7,5 g/l + Gula Pasir 22,5 g/l; E = DKW + Gula Pasir 30,0 g/l

Figure 1. Average percentage of somatic embryos formation in the use of sucrose and granulated sugar at 15, 18 and 21 weeks after culture (WAC). The same letter at the same culture age was not significantly different based on the Duncan test at α level of 5%. A = DKW + Sucrose 30.0 g / l; B = DKW + Sucrose 22.5 g / l + Granulated Sugar 7.5 g / l; C = DKW + Sucrose 15.0 g / l + Granulated Sugar 15.0 g / l; D = DKW + Sucrose 7.5 g / l Granulated Sugar 22.5 g / l; E = DKW + Granulated Sugar 30.0 g / l



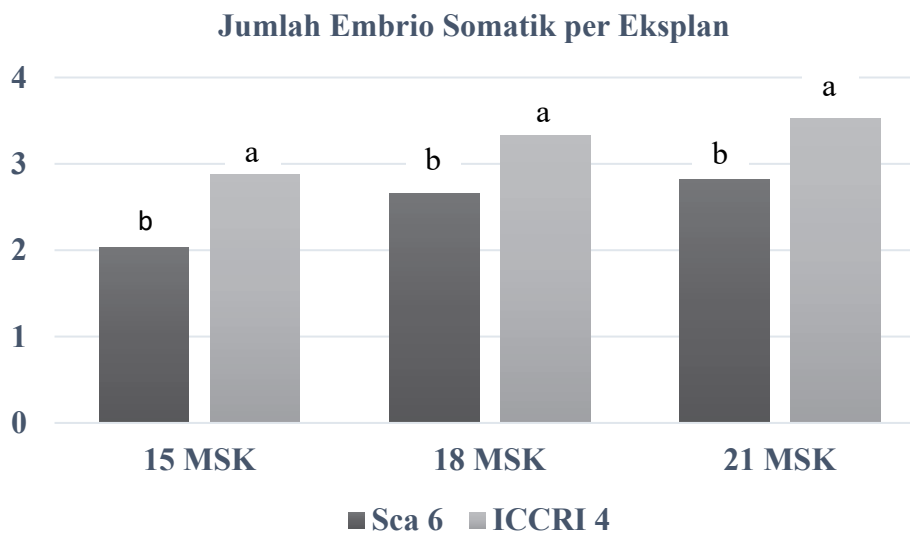
Gambar 2. Rata-rata jumlah embrio somatik kakao per eksplan pada penggunaan sukrosa dan gula pasir pada umur 15, 18 dan 21 minggu setelah kultur (MSK). Huruf yang sama pada umur kultur yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf α 5%. A = DKW + Sukrosa 30,0 g/l; B = DKW + Sukrosa 22,5 g/l + Gula Pasir 7,5 g/l; C = DKW + Sukrosa 15,0 g/l + Gula Pasir 15,0 g/l; D = DKW + Sukrosa 7,5 g/l + Gula Pasir 22,5 g/l; E = DKW + Gula Pasir 30,0 g/l

Figure 2. Average number of somatic embryos per explant in the use of sucrose and granulated sugar in media at 15, 18 and 21 weeks after culture (WAC). The same letter at the same culture age was not significantly different based on the Duncan test at α level of 5%. A = DKW + Sucrose 30.0 g / l; B = DKW + Sucrose 22.5 g / l + Granulated Sugar 7.5 g / l; C = DKW + Sucrose 15.0 g / l + Granulated Sugar 15.0 g / l; D = DKW + Sucrose 7.5 g / l + Granulated Sugar 22.5 g / l; E = DKW + Granulated Sugar 30.0 g / l



Gambar 3. Rata-rata persentase pembentukan embrio somatik pada klon Sca 6 dan ICCRI 4 umur 15, 18 dan 21 minggu setelah kultur (MSK). Huruf yang sama pada umur kultur yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf α 5%

Figure 3. The average percentage of somatic embryos formation of Sca 6 and ICCRI 4 clones at 15, 18 and 21 weeks after culture (WAC). The same letter at the same age is not significantly different based on the Duncan test at α level of 5%



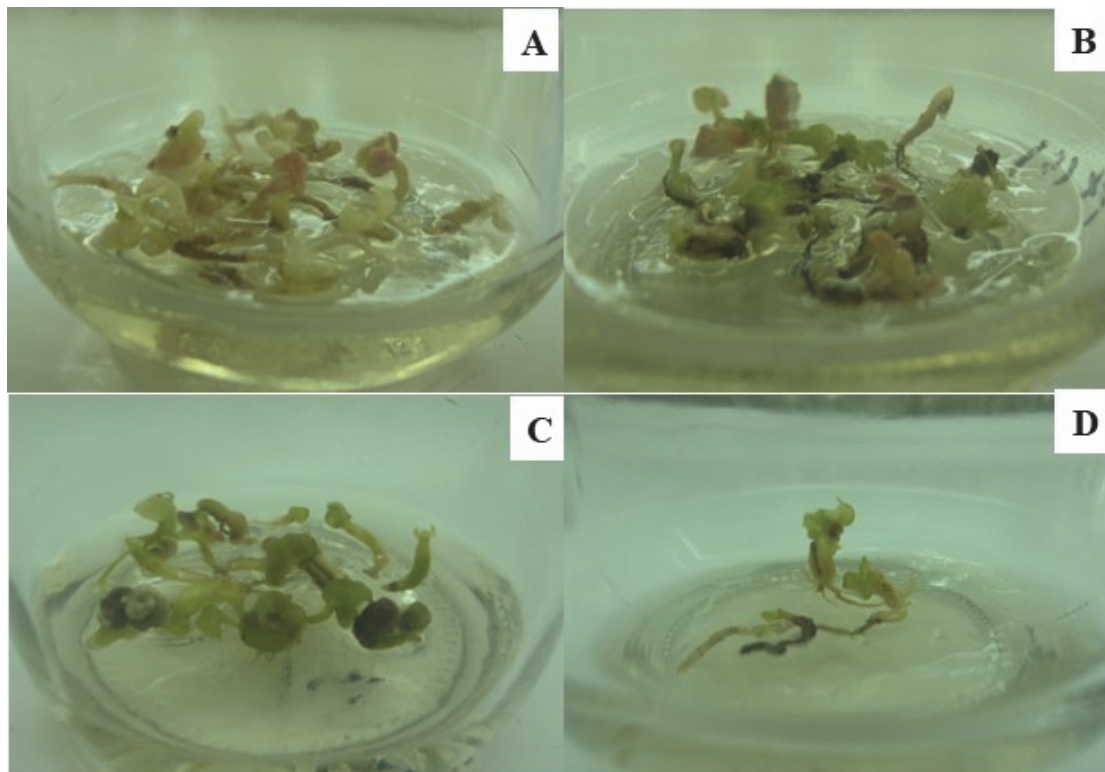
Gambar 4. Rata-rata jumlah embrio somatik per eksplan pada klon Sca 6 dan ICCRI 4 umur 15, 18 dan 21 minggu setelah kultur (MSK). Huruf yang sama pada umur kultur yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf α 5%

Figure 4. Average number of somatic embryos per explant in Sca 6 and ICCRI 4 clones at 15, 18 and 21 weeks after culture (WAC). The same letter at the same age is not significantly different based on the Duncan test at α level of 5%

Pengaruh Genotipe

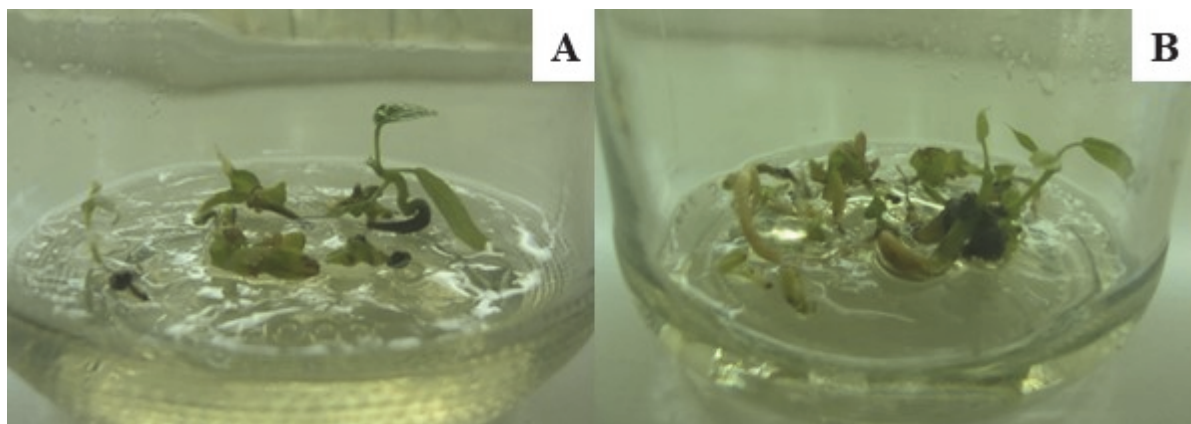
Hasil penelitian menunjukkan bahwa klon ICCRI 4 menghasilkan rata-rata persentase pembentukan embrio somatik dan jumlah embrio somatik yang nyata lebih tinggi (36,6% dan 3,5) dibandingkan klon Sca 6 (24,8% dan 2,6) (Gambar 3 dan 4), konsisten dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ajijah, Tresniawati and Syafaruddin (2019). Meskipun pada penelitian ini tidak menunjukkan interaksi yang nyata

antara jenis karbon dengan genotipe, namun pada tanaman kentang dilaporkan adanya perbedaan respon di antara genotipe kentang terhadap sukrosa dan gula putih (Demo *et al.* 2008). Demikian juga pada tebu, penggunaan gula pasir pada genotipe tertentu memberikan pengaruh positif, namun pada genotipe lain menghambat pembentukan tunas (Khan *et al.*, 2006).



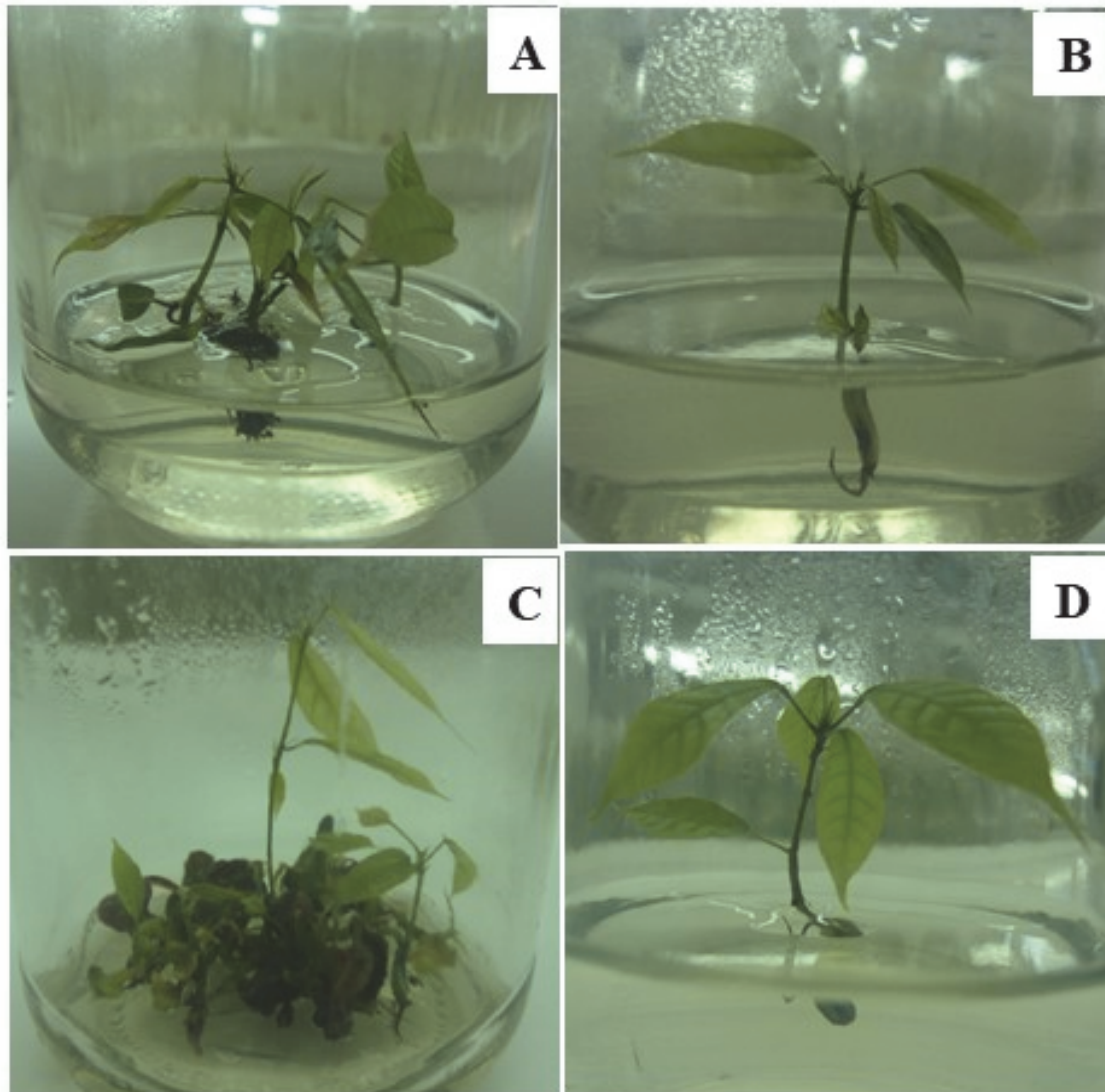
Gambar 5. Embrio somatik fase kotiledon dewasa pada klon Sca 6 menggunakan media yang mengandung sukrosa *grade* laboratorium 30 g/l (A), gula pasir 30 g/l (B), sukrosa 15.0 g/l + gula pasir 15.0 g/l (C) dan sukrosa 7.5 g/l + gula pasir 22.5 g/l (D) sebagai sumber karbon

Figure 5. Somatic embryo at mature cotyledon phase of Sca 6 clone using media containing laboratory grade sucrose 30 g/l (A), granulated sugar 30 g/l (B), sucrose 15.0 g/l + granulated sugar 15.0 g/l (C) and 7.5 g/l sucrose + sugar 22.5 g/l (D) as a carbon source



Gambar 6. Perkecambahan embrio somatik pada klon ICCRI 4 yang diinduksi dan dkecambahkan pada media yang mengandung sukrosa *grade* laboratorium (A), serta diinduksi dan dkecambahkan pada media yang mengandung gula pasir (B) sebagai sumber karbon

Figure 6. Germination of somatic embryos of ICCRI 4 clone which are induced and germinated on medium containing laboratory grade sucrose (A), as well as induced and germinated on media containing granulated sugar (B) as a carbon source



Gambar 7. Pembentukan planlet klon ICCRI 4 asal embrio somatik yang diinduksi dan didekambahkan pada media yang mengandung gula pasir (A, B) dan embrio somatik yang diinduksi dan didekambahkan pada media yang mengandung sukrosa *grade* laboratorium (C, D) sebagai sumber karbon

Figure 7. Formation of ICCRI 4 plantlets from somatic embryos induced and germinated on media containing granulated sugar (A, B) and somatic embryos induced and germinated on media containing laboratory grade sucrose (C, D) as a carbon source

Tingkat Efisiensi

Efisiensi yang dicapai melalui substitusi 30 g/l sukrosa *grade* laboratorium dengan 30 g/l gula pasir di dalam media pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik kakao di dalam penelitian ini mencapai 98,8 % per liter media (Rp. 30.000/l media dengan penggunaan sukrosa dan Rp. 360/l media dengan penggunaan gula pasir dengan asumsi harga sukrosa *grade* laboratorium Rp 1.000.000 dan gula pasir Rp. 12.000 per kg). Hal ini menunjukkan bahwa gula pasir atau gula konsumsi dan sumber gula lainnya dapat mengurangi biaya produksi.

Menurut Prakash *et al.* (2004), penggantian sukrosa (*laboratory grade*) dengan gula konsumsi dapat

menurunkan komponen biaya media sebesar 78 – 87%. Gula pasir dilaporkan telah digunakan di dalam media untuk mikropropagasi tebu (Khan *et al.*, 2006). Hasil penelitian Kadam *et al.* (2018) menunjukkan bahwa penggunaan gula konsumsi (3%) menggantikan sukrosa (3%) pada mikropropagasi tanaman kentang dapat menurunkan komponen biaya untuk sumber karbon sebesar 97%. Sementara Saraswathi *et al.* (2016) melaporkan penggantian sukrosa *grade* laboratorium dengan gula konsumsi dapat mengurangi komponen biaya untuk sumber karbon di dalam media sebesar 95%. Namun demikian, penurunan biaya produksi tidak boleh disertai dengan penurunan laju multiplikasi atau kualitas tanaman yang dihasilkan (Raghu *et al.*,

2007 dalam Saraswathi *et al.* 2016). Pada penelitian ini tidak ditemukan perbedaan morfologi pada embrio somatik yang dihasilkan di dalam media yang mengandung gula pasir dengan embrio somatik dalam media yang mengandung sukrosa atau campuran sukrosa dan gula pasir (Gambar 5). Embrio somatik yang pembentukannya diinduksi menggunakan media yang mengandung gula pasir dapat berkecambah dan membentuk planlet pada media perkecambahan yang juga mengandung gula pasir sebagai sumber karbon (Gambar 6B, 7A, dan 7B), demikian juga embrio somatik yang pembentukannya diinduksi pada media yang mengandung sukrosa *grade* laboratorium sebagai sumber karbon (Gambar 6A, 7C, dan 7D).

Pengembangan metode kultur jaringan yang lebih murah sangat diperlukan untuk menurunkan satuan biaya produksi agar harga benih per propagul bisa lebih murah. Selain melalui modifikasi media seperti pemilihan sumber karbon yang murah, efisiensi juga dapat diperoleh melalui pemilihan tipe kontainer yang tepat. Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ajjiah, Tresniawati and Syafaruddin (2019) menunjukkan bahwa botol kultur yang harganya lebih murah dapat digunakan untuk menggantikan cawan petri pada produksi embrio somatik kakao.

KESIMPULAN

Gula pasir dapat digunakan untuk menggantikan sukrosa *grade* laboratorium di dalam media pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik kakao. Penggantian sukrosa *grade* laboratorium dengan gula pasir dapat menghasilkan efisiensi sebesar 98,8% per liter media. Namun demikian, diperlukan pengujian lebih lanjut pada rentang genotipe kakao yang lebih luas untuk mengetahui respon genotipe terhadap penggunaan gula pasir di dalam media pembentukan sekaligus pendewasaan embrio somatik kakao.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan (Puslitbang Perkebunan) atas dukungan dana yang diberikan melalui DIPA No. 081-09.2.237291/2016. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada teknisi kami Cindy Amelianti atas bantuan teknis yang diberikan selama penelitian berlangsung.

KONTRIBUSI PENULIS

1. Nur Ajjiah (kontributor utama)
2. Sri Hartati (kontributor anggota)

DAFTAR PUSTAKA

- Ajjiah, N. (2016). Pengaruh komposisi media dasar dan jenis eksplan terhadap pembentukan embrio somatik kakao. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 3(3), 127–134.
- Ajjiah, N., Hartati, R. S., Rubiyono, R., Sukma, D., & Sudarsono, S. (2016). Effective cacao somatic embryo regeneration on kinetin supplemented DKW medium and somaclonal variation assessment using SSRs markers. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science*, 38(1), 80–92. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v38i1.619>
- Ajjiah, N., Tresniawati, C., & Syfaruddin, S. (2019). Pengaruh tipe kontainer kultur pada keberhasilan pembentukan embrio somatik kakao. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 6(Juli 2019), 89–98.
- Alkhateeb, A. (2008). Comparison effects of sucrose and date palm syrup on somatic embryogenesis of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *American Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4(June), 19–23. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2008.19.23>
- Armas, I., Pogrebnyak, N., & Raskin, I. (2017). A rapid and efficient in vitro regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Methods*, 13(58), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0208-0>
- Buah, J. N., Kawamitsu, Y., Yonemori, S., Hayashi, M., & Murayama, S. (2000). Effects of various carbon sources and their combinations on in vitro growth and photosynthesis of banana plantlets. *Plant Production Science*, 3(4), 392–397. <https://doi.org/10.1626/pp.3.392>
- Demo, P., Kuria, P., Nyende, a B., & Kahangi, E. M. (2008). Table sugar as an alternative low cost medium component for in vitro micro-propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 7(15), 2578–2584. <https://doi.org/10.5897/AJB08.263>
- Dipti, Fatima, S., & Mujib, A. (2014). Morphological anomalies in somatic embryo structure in *Catharanthus roseus*: Improving embryo germination by amending plant growth regulators, activated charcoal and sucrose Level, *British Biotechnology Journal* 4(1), 10–20.

- Kadam, D. D., Chhatre, A. A., Lavale, S. A., & Shinde, N. A. (2018). Low-cost alternatives for conventional tissue culture media. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 7(04), 2523–2529.
- Khan, I. A., Dahot, M. U., & Khatri, A. (2006). Effect of sucrose and growth regulators on the micropropagation of sugarcane clones. *Pak. J. Bot.*, 38(December), 961–967.
- Khan, U. W., Ahmed, R., Shahzadi, I., & Maroof Shah, M. (2015). Some important factors influencing tissue culture response in wheat. *Sarhad Journal of Agriculture*, 31(4), 199–209.
- Li, Z., Traore, A., Maximova, S., & Gultinan, M. J. (1998). Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao using thidiazuron. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant Culture*, 34, 293–299.
- Mamiya, K., & Sakamoto, Y. (2000). Effects of sugar concentration and strength of basal medium on conversion of somatic embryos in *Asparagus officinalis* L. *Biology*, 84, 15–26.
- Michel, Z., Hilaire, K. T., Mongomaké, K., Nguessan, A., & Justin, K. Y. (2008). Effect of genotype, explants, growth regulators and sugars on callus induction in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 2(1), 1–9.
- Ozkaynak, E., Yoksel, F., Erust, N., & Simsek, T. (2016). Effects of using gelling agent guar gum and different sugar sources on potato micropropagation. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Science*, 3(4), 249–254.
- Placide, R., Clément, U., Fraçoise, U., & Védaste, A. (2012). Comparative study of effects of table sugar, laboratory grade sucrose and mannitol on growth of banana plantlets under in vitro conditions. *Rwanda Journal*, 28, 76–83.
- Prakash, S., M.I. Hoque, and T. Brinks. 2004. Culture media and containers. In: *Low Cost Options for Tissue Culture Technology in Developing Countries. Proceedings of Workshop of FAO-IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture*. Vienna, 26-30 August 2002
- Ramart, E. J. L. A., Puchooa, D., & Khoiratty, S. S. S. (2010). Local sugars alternatives for tissue culture of *Dendrobium Hybrid CV. Sonia*. *University of Mauritius Research Journal*, 16(1), 345–364.
- Saraswathi, M. S., Uma, S., Kannan, G., Selvasumathi, M., Mustaffa, M. M., & Backiyarani, S. (2016). Cost-effective tissue culture media for large-scale propagation of three commercial banana (*Musa* spp.) varieties. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(1), 23–29. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.1117227>
- Satoh, K., Ooka, H., Wakai, A., Takahar, Y., & Yamamoto, K. (2000). Osmotic and non-osmotic induction of somatic embryogenesis by sucrose at high concentration in *Daucus carota* L. *Plant Biotechnology*, 17(2), 155–158.
- Sharm, V., Singh, I., & Sharma, S. (2013). Formulation of medium with low cost optimizations for in vitro caulogenesis in ethnomedicinal herb *Stevia rebaudiana*. *Trend in Biotechnology Research*, 2(1), 36–40.
- Smith, C., 1995. *Carbohydrate chemistry*. In : *Plant biochemistry and molecular biology*. Chichester: John Wiley & Sons, pp.73-111.
- Swamy, M. K., Sudipta, K. M., Balasubramanya, S., & Anuradha, M. (2010). Effect of different carbon sources on in vitro morphogenetic response of Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth). *Journal of Phytology*, 2(8), 11–17.
- Tremblay, L., & Tremblay, F. M. (1995). Maturation of black spruce somatic embryos: Sucrose hydrolysis and resulting osmotic pressure of the medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42, 39–46.
- Tyagi, R. K., Agrawal, A., Mahalakshmi, C., Hussain, Z., & Tyagi, H. (2007). Low-cost media for in vitro conservation of turmeric (*Curcuma longa* L.) and genetic stability assessment using RAPD markers. *In Vitro Cell and Developmental Biology – Plant*, 43(1), 51–58.
- Widoretno, W., Indriyani, S., & Martasari, C., & Hakin, R. (2017). Effects of Sugar type and concentration on Batu 55 Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) somatic embryo maturation. *AGRIVITA Journal of Agricultural Science* 39(1), 100–110.
- Yang, H., Cheng, J.-C., & Kamada, H. (2000). Multiple pathways of somatic embryogenesis at a high frequency in *Asparagus officinalis* L. *Plant Biotechnology*, 17(2), 111–118.
- Yildirim, T. (2005). *Induction of embryogenictissue and development of somatic embryos in Pinus brutia* TEN. Thesis. Middle East Technology University.