

**OPTIMASI ENKAPSULASI PADA EMBRIO SOMATIK
DAN IMMATURE EMBRYO KAKAO
(*Theobroma cacao* L.)**

**Encapsulate Optimazion of Somatic Embryo
and Immature Cocoa Embryo
(*Theobroma cacao* L.)**

**TESIS
MAGISTER PERTANIAN**

**Oleh
EKO HADI CAHYONO
NIM 061520101019**

**PROGRAM STUDI AGRONOMI
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS JEMBER
2009**

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRACT	xiii
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Permasalahan	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Benih Kakao	4
2.2 Bahan Pembungkus <i>Artificial Seed</i>	5
2.3 <i>Artificial Seed</i> /Biji Buatan.....	8
2.4 Eksplan Untuk Pembuatan <i>Artificial Seed</i>	9
2.5 Biaya Bahan Tanam Kakao.....	11
2.6 Hipotesis	11
III. BAHAN DAN METODE	
3.1 Waktu dan Tempat	12
3.2 Bahan dan alat	12
3.3 Metode Percobaan.....	13
3.4 Pelaksanaan Percobaan	
3.4.1 Sterilisasi Alat	13
3.4.2 Pembuatan Media	13
3.4.3 Persiapan Eksplan	14
3.4.4 Prosedur Enkapsulasi	17
3.4.5 Pengemasan dan Penyimpanan <i>Artificial seed</i>	17
3.4.6 Pengujian Kemampuan Tumbuh dan Ketahanan Hidup	17
3.4.7 Perlakuan Kontrol (konsentrasi alginat 0%).....	18
3.5 Parameter Yang Diamati.....	18

3.5.1	Parameter Selama Masa Enkapsulasi Dan Penyimpanan.....	18
3.5.2	Parameter Pengujian Kemampuan Tumbuh.....	19
3.5.3	Parameter Pra Aklimatisasi.....	19

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1	Pengamatan Visual Selama Pembuatan Dan Penyimpanan <i>Artificial Seed</i>	20
4.2	Hasil Pengujian Daya Tumbuh Setelah Penyimpanan.....	22
4.2.1	Persentase Eksplan Hidup.....	23
4.2.2	Jumlah Akar Baru.....	26
4.2.3	Panjang Akar Baru.....	28
4.2.4	Persentase Berakar Baru.....	31
4.2.5	Pertumbuhan Tunas	34
4.2.6	Pengaruh Cahaya Terhadap Penyimpanan <i>Artificial Seed</i>	36
4.3	Pra Aklimatisasi.....	38
4.4	Analisa Biaya Pembuatan <i>Artificial Seed</i>	40

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1	Simpulan	41
5.2	Saran	41

DAFTAR PUSTAKA	42
-----------------------------	----

LAMPIRAN	47
-----------------------	----

DAFTAR TABEL

No	Judul	Halaman
1.	Spesies ganggang coklat dan persentase D-manoronat dan L-guluronat	7
2.	Tahapan Perkembangan Eksplan Kakao Dan Media Yang Digunakan Dalam Pelaksanaan Penelitian.....	16
3.	Keberhasilan Pembentukan <i>Artificial Seed</i>	20
4.	Pengurangan Bobot Kapsul (%) Selama Penyimpanan	21
5.	Rangkuman Kuadrat Tengah Persentase Eksplan Hidup.....	23
6.	Rangkuman Kuadrat Tengah Jumlah Akar Baru.....	26
7.	Rangkuman Kuadrat Tengah Panjang Akar Baru	28
8.	Rangkuman Kuadrat Tengah Persentase Eksplan Berakar Baru	31
9.	Rangkuman Kuadrat Tengah Persentase Pertumbuhan Tunas	34
10.	Pertumbuhan Tunas (mm) Selama Masa Penyimpanan	35
11.	Jumlah Eksplan Yang Menjadi Bibit Mikro Kakao Setelah 1 Bulan Pra Aklimatisasi	39
12.	Bibit Mikro Kakao Yang Hidup Setelah 1 Bulan Pra Aklimatisasi.....	39
13.	Parameter Pra Aklimatisasi <i>Artificial Seed</i> Eksplan KE	39
14.	Biaya Pembuatan <i>Artificial seed</i>	40

DAFTAR GAMBAR

No	Judul	Halaman
1.	Struktur Polimer Asam Alginat	6
2.	Struktur Rangkaian D-Manoronat Dan L-Guluronat Dalam Asam Alginat	7
3.	Interaksi Kalsium dan Alginat	8
4.	Tahapan Eksplan sampai Pra Aklimatisasi	15
5.	Keberhasilan Pembentukan <i>Artificial seed</i>	20
6.	Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap % Eksplan Hidup	23
7.	Pengaruh Macam Eksplan Terhadap Persentase Eksplan Hidup	24
8.	Interaksi Alginat Dengan Eksplan Pada Penyimpanan <i>Artificial Seed</i> 3 Minggu	25
9.	Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap Jumlah Akar Baru	26
10.	Pengaruh Macam Eksplan Terhadap Jumlah Akar Baru	27
11.	Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap Panjang Akar Baru.....	29
12.	Pengaruh Macam Eksplan Terhadap Panjang Akar Baru	29
13.	Interaksi Alginat Dengan Eksplan Pada Penyimpanan <i>Artificial Seed</i> 4 Minggu	30
14.	Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap Persentase Berakar Baru.....	31
15.	Pengaruh Macam Eksplan Terhadap Persentase Berakar Baru	32
16.	Interaksi Alginat Dengan Eksplan Pada Penyimpanan 1 Minggu.....	33
17.	Interaksi Alginat Dengan Eksplan Pada Penyimpanan 3 Minggu.....	33
18.	Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap Pertumbuhan Tunas Eksplan	34
19.	Pengaruh Macam Eksplan Terhadap Pertumbuhan Tunas	35
20.	Pengaruh Cahaya Terhadap Panjang Akar Baru Penyimpanan <i>Artificial Seed</i> 3 Minggu.....	36
21.	Pengaruh Cahaya Terhadap Persentase Berakar Baru Pada Penyimpanan <i>Artificial Seed</i> 3 Minggu	36
22.	Pengaruh Cahaya Terhadap Pertumbuhan Tunas Pada Penyimpanan <i>Artificial Seed</i> 3 Minggu	36

DAFTAR LAMPIRAN

No	Judul	Halaman
1	Pengamatan persentase eksplan hidup setelah 28 hari pada penyimpanan <i>artificial seed</i> 3 minggu	47
1.1	Data Pengamatan Persentase Eksplan Hidup.....	47
1.2	Data Transformasi Arcsin $\sqrt{\%}$ Persentase Eksplan Hidup.....	47
1.3	Tabel Dua Arah Alginat Dengan Eksplan	48
1.4	Tabel Dua Arah Alginat Dengan Cahaya	48
1.5	Tabel Dua Arah Eksplan Dengan Cahaya	48
1.6	Tabel Analisis Ragam Persentase Eksplan Hidup	48
1.7	Hasil Uji BNJ 5% Perlakuan Konsentrasi Alginat (A)	48
1.8	Hasil Uji BNJ 5% Perlakuan Jenis Eksplan (K)	48
1.9	Hasil Uji BNJ 5% Interaksi Alginat dengan Eksplan (A x K).....	49
2.	Berat <i>Artificial seed</i> dan pengurangan bobot akibat penguapan	50

ABSTRACT

The conventional methods in cocoa tree multiplication can not supply the rising demand of cocoa seed nor seedling. Tissue culture can give more advantage if plantlet could be present as *artificial seed*. In fact, there is no optimal encapsulate technic in cocoa *artificial seed* yet. This research was conducted: To get optimal (1) concentration of alginate and (2) explants, to be made as artificial seed; 3). To know the influence of light exposure during artificial seed storage; 4) To know the interaction among alginate, explants and light during artificial seed storage; 5) To know the effect of storage toward viability of artificial seed. The research was based on Factorial Randomized Complete Design design, wit 3 Fctors and 3 replication. The first factors were concentration of natrium alginate : 0 % (control/A0), 2.25 % (A1), 2.5 0% (A2) and 2.75 % (A3). The second factors were : 1.) Embryo somatic (KSE), 2) Enrooted Embryo Zygotic (KE); 3) Rooted Embryo Zygotic (KAE). The third factor were : light exposure at the storage (C1) and without light exposure (C0). *Artificial seeds* were stored one week, two weeks, three weeks, and four weeks. This research showed that an interaction between A3 and KE had lifetime equal to control, new root percentage 83,33 after 3 weeks. Explants KE had higher life explants (70,83%), number of new root (1,0), new root length (2,67 mm), new root percentage (58,33%) and bud growing (12,71 mm) after 4 weeks, than explants KSE and KAE. Light exposure influence bud growing, new root percentage and new root length during artificial seed storage within 3 weeks.

Keywords: artificial seed, encapsulation, *Theobroma cacao*

ABSTRAK

Metode perbanyakan kakao secara konvensional tidak dapat memenuhi kebutuhan benih ataupun bibit kakao yang semakin meningkat. Kultur jaringan mampu memenuhi kekurangan tersebut karena memiliki potensi untuk menghasilkan plantlet yang seragam dalam jumlah banyak. Namun metode tersebut memiliki kekurangan dalam hal : 1) Kemasan plantlet dalam botol dan 2) Aklimatisasi sebelum ditanam dilapang. Kultur jaringan dapat lebih menguntungkan bila plantletnya dapat dikemas dalam bentuk *artificial seed*. Permasalahannya hingga saat ini belum ada teknik enkapsulasi yang optimal untuk hasil kultur jaringan kakao. Tujuan penelitian ini adalah: 1) Mendapatkan konsentrasi optimal alginat; 2) Mendapatkan macam eksplan yang optimal untuk pembuatan *artificial seed*; 3) Mengetahui pengaruh cahaya dalam penyimpanan *artificial seed*; 4) Mengetahui interaksi antara alginat, eksplan dan cahaya dalam penyimpanan *artificial seed*; 5) Mengetahui pengaruh penyimpanan terhadap kemampuan tumbuh dan ketahanan hidup *artificial seed*. Metode penelitian disusun menurut RAL Faktorial dengan 3 ulangan. Faktor Pertama adalah konsentrasi natrium alginat dengan 4 taraf yaitu : 0 % (kontrol/A0), 2.25 % (A1), 2.50% (A2) dan 2.75% (A3). Faktor kedua 3 macam eksplan yaitu: 1) Embrio Somatik fase kotiledon hasil perbanyakan secara *in vitro* somatik embryogenesis (KSE); 2) Embrio zigotik belum berakar (KE); 3) Embrio zigotik sudah berakar (KAE). Faktor ketiga adalah pemberian cahaya pada penyimpanan (C1) dan tanpa cahaya (C0). *Artificial seed* disimpan 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu. Penelitian menunjukkan interaksi konsentrasi alginat A3 dan macam eksplan KE mempunyai rata-rata persentase hidup sama dengan kontrol, persentase eksplan berakar baru 83,33% sampai penyimpanan *artificial seed* 3 minggu. Eksplan KE mempunyai rata-rata persentase eksplan hidup, jumlah akar baru, panjang akar baru, persentase berakar baru dan pertumbuhan tunas lebih tinggi dibanding eksplan KSE dan KAE sampai penyimpanan 4 minggu. Pemberian cahaya selama penyimpanan sampai 3 minggu meningkatkan pertumbuhan tunas, persentase berakar baru dan panjang akar baru.

Kata kunci : *artificial seed*, enkapsulasi, *Theobroma cacao*

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan salah satu komoditas andalan nasional dan berperan penting bagi perekonomian Indonesia, terutama dalam hal penyediaan lapangan kerja, sumber pendapatan petani dan sumber devisa negara. Peranan kakao bagi pengembangan perekonomian masyarakat pedesaan sudah terbukti saat terjadi krisis ekonomi pada tahun 1997. Potensi untuk menggunakan industri kakao sebagai salah satu pendorong pertumbuhan dan distribusi pendapatan cukup terbuka. Kakao memberikan sumbangan devisa terbesar ketiga sub sektor perkebunan dengan nilai sebesar US \$ 664,3 juta pada tahun 2005 (Direktori Perkebunan Indonesia, 2007 – 2008).

Sekitar 92 % produk biji kakao Indonesia dihasilkan oleh petani, dan selebihnya dihasilkan oleh perkebunan besar milik negara dan swasta (Statistik Ditjen Perkebunan, 2007). Aktivitas produksi kakao di Indonesia melibatkan lebih dari 1,1 juta petani yang mengandalkan kakao sebagai sumber mata pencarian (Direktori Perkebunan Indonesia, 2007 – 2008).

Perkebunan kakao di Indonesia saat ini berumur lebih dari 25 tahun sehingga produktivitasnya hanya setengah dari potensinya. Kebun dibangun dengan benih asalan serta belum banyak adopsi penggunaan tanaman klonal yang unggul (Direktori Perkebunan Indonesia, 2007 – 2008). Salah satu program untuk meningkatkan produktivitas kakao adalah dengan melakukan peremajaan tanaman kakao tua dan tidak produktif menggunakan bahan tanam unggul. Penyediaan bibit kakao dalam jumlah banyak yang bermutu tinggi dalam waktu yang cepat sangat diperlukan untuk memenuhi kebutuhan tersebut.

Perbanyakan kakao secara generatif dilakukan menggunakan benih. Benih sebagai bahan tanam mempunyai kelemahan yaitu tingginya variasi produksi dari setiap individu tanaman. Perbanyakan secara vegetatif umumnya menggunakan setek, okulasi, dan sambung pucuk. Bahan tanam vegetatif yang diperoleh melalui setek cabang ortotrop lebih seragam, tetapi jumlahnya

terbatas. Untuk okulasi dan sambung pucuk diperlukan batang bawah dan batang atas. Penyediaan bahan tanam dalam jumlah besar mengalami kendala terbatasnya kedua macam bahan tersebut, terutama batang atas (Winarsih *et al.*, 2002). Dengan demikian perbanyak vegetatif tidak dapat menyediakan bibit kakao dalam jumlah besar.

Benih kakao termasuk benih rekalsitran, artinya benih akan kehilangan daya tumbuhnya apabila kandungan air dibawah nilai kritis. Benih rekalsitran juga tidak tahan dikeringkan, tidak tahan disimpan pada suhu rendah dan tidak mempunyai masa dormansi (Chin dan Robert, 1980; Pence, 1992; Benson, 2000; Fang, *et al.*, 2004). Benih kakao yang dikeluarkan dari buahnya, dapat segera berkecambah dalam waktu 3 – 4 hari dan kehilangan daya kecambahnya.

Menurut Rahardjo dan Wahyudi (2006), kebutuhan benih kakao dalam rangka revitalisasi perkebunan kakao di Indonesia selama 5 tahun (2006 – 2010) akan meningkat. Estimasi kebutuhan benih sebagai berikut : 29,3 juta butir (2006); 63,2 juta butir (2007); 84,9 juta butir (2008); 86,1 juta butir (2009); 80,10 juta butir (2010). Sedangkan ketersediaan benih hibrida kakao sebagai bahan tanam unggul diperkirakan hanya mencapai 20 – 30 juta butir per tahun.

Metode konvensional tidak dapat memenuhi kebutuhan bibit unggul kakao, karena itu perlu dipertimbangkan pemanfaatan teknik kultur jaringan. Ragapadmi (2002) menyebutkan bahwa teknik kultur jaringan dapat digunakan untuk menghasilkan bibit dan plantlet mikro dalam jumlah banyak, seragam, *true of tipe*, dalam waktu relatif singkat, dan tidak tergantung musim. Namun teknik ini memiliki kelemahan yaitu ‘kemasan’ plantlet dalam botol dan perlunya aklimatisasi sebelum tanam, sehingga mendorong pengembangan teknik lebih lanjut dalam bentuk *artificial seed*.

Siahaan (1996) menyatakan *artificial seed* adalah eksplan (embrio somatik atau meristem, atau tunas pucuk) yang dibungkus dengan suatu bahan penyalut khusus (enkapsulasi) supaya tidak rusak, dapat disimpan dan dapat dikecambahkan. *Artificial seed* merupakan salah satu cara untuk dapat

menyimpan embrio somatik, mata tunas, potongan pucuk muda, embrio yang diisolasi dari keping benih, titik tumbuh dengan tujuan mencegah penurunan daya tumbuh. Teknik ini juga dapat meningkatkan efisiensi pengiriman benih (Haris dan Mathius, 1995).

Teknik enkapsulasi diharapkan akan menjadi salah satu cara penanganan bibit hasil kultur jaringan kakao agar dapat ditanam langsung di lapang. Teknik ini diharapkan dapat mempermudah pengemasan, pengangkutan dan distribusi bibit untuk jarak jauh, dan sebagai *carrier* pada kapsul pembungkus dapat disertakan nutrisi, zat pengatur tumbuh, dan bahan protektan yang dapat menjaga viabilitas *artificial seed* (Haris dan Mathius, 1995).

1.2 Permasalahan

Belum ada teknik yang optimal untuk membuat *artificial seed* kakao dari eksplan hasil kultur jaringan.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mendapatkan jenis eksplan yang optimal untuk pembuatan *artificial seed*
2. Mendapatkan konsentrasi optimal alginat untuk enkapsulasi eksplan hasil kultur jaringan kakao
3. Mengetahui pengaruh cahaya selama penyimpanan *artificial seed*
4. Mengetahui pengaruh interaksi antara alginat, macam eksplan dan cahaya selama penyimpanan *artificial seed*
5. Mengetahui pengaruh penyimpanan terhadap kemampuan tumbuh dan viabilitas *artificial seed* kakao.
6. Mengetahui biaya pembuatan *artificial seed*.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan eksplan dan teknik pembuatan *artificial seed* kakao yang optimal.
2. Teknologi enkapsulasi bibit mikro ini dapat dimanfaatkan untuk keperluan penyimpanan plasma nutfah

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Benih Kakao

Benih kakao adalah benih rekalsitran, yakni benih yang untuk mempertahankan hidupnya memerlukan kadar air dalam benih sekitar 50%, suhu antara 18° – 30 °C, kelembaban relatif udara mendekati 100%, aerasi baik dan tidak ada aktivitas jamur. Benih kakao setelah mencapai masak fisiologis, mengalami proses kemunduran sangat cepat (Rahardjo, 1995). Menurut Chin dan Robert (1989), dengan tingginya kadar air benih maka proses respirasi dan metabolisme semakin meningkat, terjadi perombakan dan peruraian enzim sehingga aktivitas enzim menjadi jauh berkurang bahkan tidak berfungsi lagi. Bila aktivitas enzim tidak berfungsi maka benih akan kehilangan kemampuan untuk berkecambah.

Daya tumbuh benih kakao yang masih berada dalam buah mampu bertahan sampai 20 hari, walaupun kulit buah sudah mengeras dan mengering (Evans, 1950 dalam Rahardjo dan Wahjudi, 2006). Namun mempertahankan daya kecambah benih kakao dalam buah mengandung resiko terbawanya hama dan penyakit yang akan mendorong kemunduran benih. Selain itu, pengiriman benih kakao dalam bentuk buah akan memperbesar biaya pengangkutan, mengingat 60-80% dari berat buah kakao merupakan kulit buah. Upaya untuk mengantisipasi kelemahan benih konvensional tersebut antara lain dengan teknik kultur jaringan.

Kultur jaringan kakao melalui organogenesis dilakukan antara lain dengan pucuk tunas (Orchard *et al.*, 1979), pucuk meristem (Adu-Ampomah *et al.*, 1992), induksi tunas aksiler dari kecambah steril (Tamin, 1991 ; Winarsih dan Priyono, 1995). Namun dalam pelaksanaannya masih terdapat hambatan karena pengkalusan, pencoklatan dan adanya lendir berlebihan dari jaringan vegetatif. Oleh karena itu dikembangkan embriogenesis somatik dengan eksplan embrio zigotik dan organ bunga (Winarsih *et al.*, 2003).

Embriogenesis somatik dari embrio zigotik kakao telah dilaporkan oleh Esan (1975), Pence *et al.*, (1979), Lee dan Rao (1982), Tahardi (1984), dan

Adu-Ampomah *et al.*, (1998). Penelitian yang dilakukan oleh Winarsih *et al.* (2002) dan Winarsih *et al.* (2003) menunjukkan bahwa embrio somatik yang berasal dari embrio zigotik dan organ bunga dapat berkembang menjadi plantlet normal.

Keberhasilan teknik kultur jaringan menghasilkan plantlet/bibit mikro kakao belum dapat menjawab kendala berupa transportasi bibit dari tempat produksi ke lahan perkebunan. Hal ini disebabkan plantlet berada dalam 'kemasan' botol dan memerlukan aklimatisasi di rumah kaca sebelum siap ditanam di lahan. Perlu dikembangkan teknik lebih lanjut agar plantlet/bibit mikro bisa lebih mudah diangkut dan dapat langsung ditanam, yakni dalam bentuk *artificial seed* atau benih buatan.

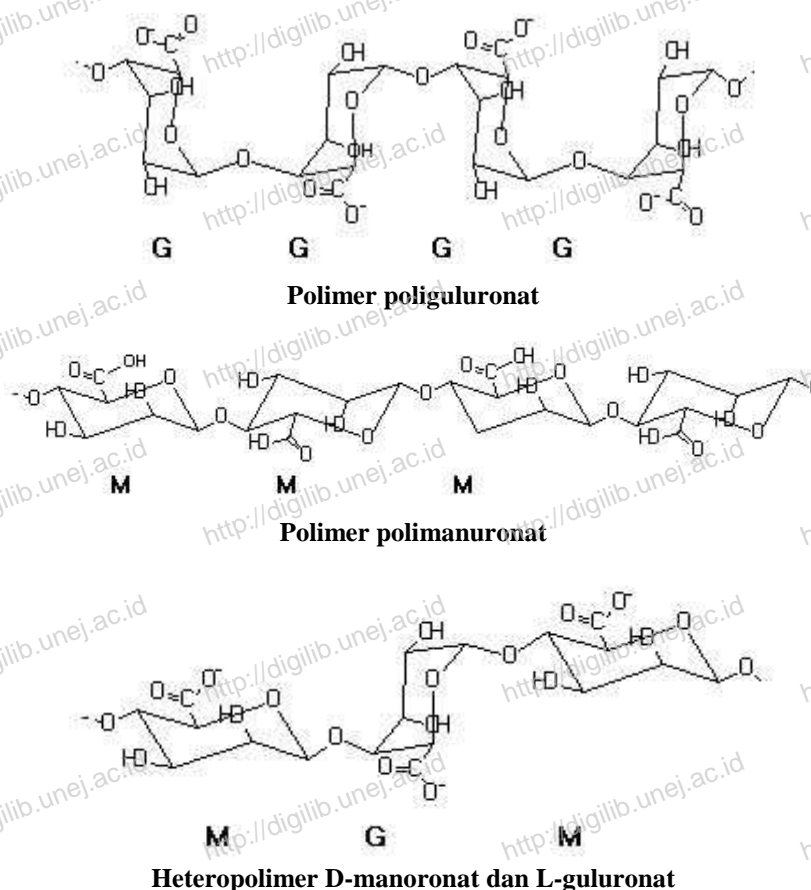
Artificial seed dibuat dengan teknik enkapsulasi. Teknik enkapsulasi (alginasi) merupakan suatu teknik pembungkusan eksplan (embrio somatik atau meristem, atau tunas pucuk) dengan suatu bahan penyalut khusus yang membuat eksplan tidak rusak, dapat disimpan, dan dikecambahkan (Siahaan, 1996). Pada beberapa jenis tanaman, teknik enkapsulasi yang dilakukan pada tunas pucuk tunas aksilar dapat menghasilkan plantlet yang seragam (Sudarmonowati dan Bachtiar 1994; Sudarmonowati 1995; Piccioni and Standardi, 1995). Teknik enkapsulasi untuk tujuan penyimpanan plasma nutfah bahkan sudah dilakukan pada tingkat sel (Wang dan Perl, 2006). Pada perkecambahan somatik embrio jeruk yang dienkapsulasi, penambahan sukrosa 2% dan 1% pati pada media perkecambahan meningkatkan daya tumbuh bisa mencapai dua kali lipat (Jung *et al.*, 2004).

2.2 Bahan Pembungkus *Artificial Seed*

Salah satu bahan pembungkus *artificial seed* adalah alginat. Alginat dalam bentuk asam alginat didefinisikan oleh Cybercolloids sebagai suatu karbohidrat koloid hidrofilik yang diekstrak dari berbagai species ganggang coklat (*Phaeophyceae*). Secara komersil, alginat dikenal dengan berbagai nama seperti natrium alginat, kalium alginat, amonium alginat dan propilen glikol alginat. Asam alginat dipasarkan dalam bentuk bubuk serat yang

berwarna putih sampai putih kekuning-kuningan, tidak berbau dan tidak berasa. Alginat bersifat lebih permeabel dibanding substrat agar dan dapat larut pada suhu kamar tanpa panas (Bapat *et al.*, 1987).

Asam alginat merupakan glukoronoglikan berantai lurus yang terdiri dari D-manurot dan L-guluronat dalam bentuk cincin piranosa yang atomnya berikatan 1.4 (Fardiaz, 1989; Barbotin, *et al*, 1992). Melalui hidrolisis ringan asam alginat dapat dipisahkan menjadi tiga jenis potongan polimer asam alginat, yaitu pertama : polimer polimanuronan yang terdiri dari D-asam manuronat, yang kedua : polimer poliguluronat yang terdiri dari L-guluronat, dan yang ketiga : heteropolimer yang terdiri dari D-manoronat dan L-guluronat yang terletak berselang seling (Gambar 1).

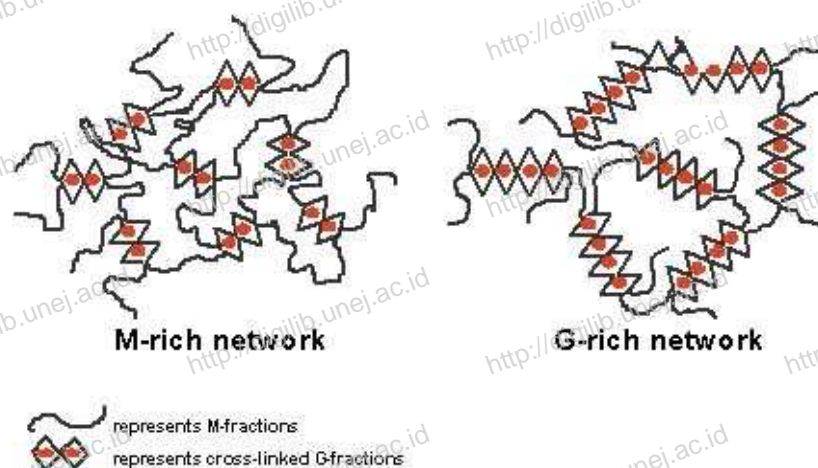


Gambar 1. Struktur Polimer Asam Alginat (www.genialab.de/inventory/alginate.htm)

Prosentase D-manoronat dan L-guluronat pada asam alginat tergantung pada spesies ganggang coklat yang digunakan. Spesies ganggang coklat dan prosentase D-manoronat dan L-guluronat yang dikandungnya disajikan dalam tabel 1. Adapun struktur D-manoronat dan L-guluronat diilustrasikan dengan Gambar 2.

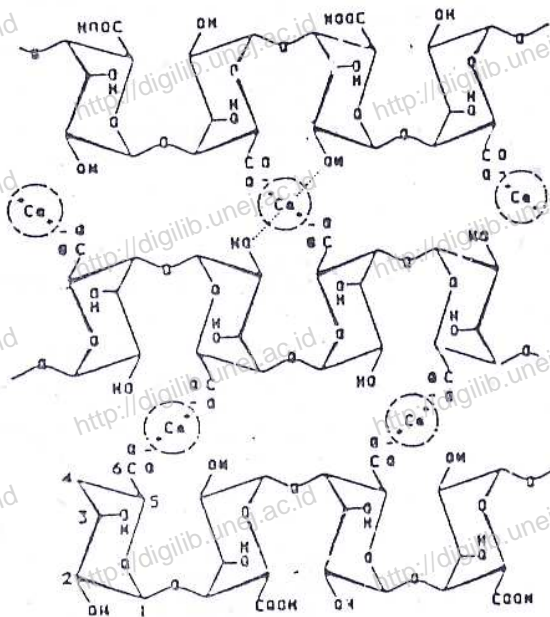
Tabel 1. Spesies ganggang coklat dan persentase D-manoronat dan L-guluronat

No	SEAWEED	M/G	% M	% G	% MM	% GG
1	<i>Laminaria hyperborea</i> (stem)	0,45	30	70	18	58
2	<i>Laminaria hyperborea</i> (leaf)	1,22	55	45	36	26
3	<i>Laminaria digitata</i>	1,22	55	45	39	29
4	<i>Macrocystis pyrifera</i>	1,50	60	40	40	20
5	<i>Lessonia nigrescens</i>	1,50	60	40	43	23
6	<i>Ascophyllum nodosum</i>	1,86	65	35	56	26
7	<i>Laminaria japonica</i>	1,86	65	35	48	18
8	<i>Durvillea antarctica</i>	2,45	71	29	58	16
9	<i>Durvillea potarum</i>	3,33	71	23	69	13



Gambar 2. Struktur Rangkaian D-Manoronat Dan L-Guluronat Dalam Asam Alginat (www.genialab.de/inventory/alginate.htm)

Sifat yang paling berguna dari alginat adalah kemampuannya untuk bereaksi dengan kation-kation logam polivalen, khususnya ion-ion kalsium, menghasilkan : (1) larutan yang lebih kental, (2) gel, atau (3) polimer-polimer yang tidak larut. Reaksi ini terjadi karena adanya kation kalsium yang berikatan dengan anion karboksilat seperti nampak pada Gambar 3.



Gambar 3. Interaksi Kalsium dan Alginat
(Siahaan F.R., 1996)

2.3 Artificial Seed/Biji buatan

Penelitian mengenai teknologi biji buatan ditujukan untuk mengatasi kendala bagi tanaman yang penyediaan bijinya terbatas dan tanaman yang memiliki keragaman genetik karena perbanyakannya secara generatif. *Artificial seed* atau biji buatan atau biji sintetik atau biji somatik adalah sebutan dari embrio somatik yang mampu tumbuh dan berkembang membentuk struktur dan sifat seperti embrio zigotik. Secara ekonomi, biji sintetik diharapkan dapat diproduksi dalam skala besar pada berbagai tanaman unggul (Bapat, 1993).

Selubung atau kapsul yang membungkus embrio somatik pada biji buatan atau biji sintetik, bertujuan memberi kondisi seperti pada benih alami, dimana embrio terlindung oleh endosperma atau kotiledon dan kulit biji yang cukup kuat. Sebagaimana endosperm, dalam bahan kapsul dapat

diinkorporasikan nutrisi, antibiotik, fungisida atau mikroorganisme penambat nitrogen seperti *Rhizobium*, zat pengatur tumbuh dan komponen lain yang penting bagi pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik menjadi tanaman. Dengan demikian, sesuai pendapat Siahaan (1996), selubung embrio somatik juga harus tahan terhadap sistem pengepakan, penyimpanan, pengiriman dan penanaman.

Fungsi utama yang harus dimiliki biji sintetis adalah kemampuan memberikan kondisi optimum yang memungkinkan pertumbuhan dalam waktu singkat dan mampu menghasilkan embrio somatik dalam jumlah banyak yang bisa berkembang menjadi tanaman (Li, 1990). Faktor terpenting yang menentukan keberhasilan teknologi biji buatan adalah kemampuan membuat sistem produksi embrio somatik yang mampu tumbuh. Faktor lain yang menentukan menurut Redenbaugh dan Ruzin (1988), adalah keseragaman perkembangan embrio somatik, penggunaan komponen kapsulasi yang tidak toksik, viabilitas embrio yang tetap tinggi setelah penyimpanan dan pertumbuhan kapsulasi embrio somatik setelah aklimatisasi.

Produksi biji buatan dari enkapsulasi embrio somatik alfalfa dan seledri telah dilakukan oleh Redenbaugh, *et al.* (1985) dengan menggunakan bahan selubung hidrogel natrium alginat yang kemudian berhasil ditanam di rumah kaca. Kitto dan Janick (1985) membungkus embrio somatik wortel dengan 2,5% polietilen oksida. Namun demikian teknik ini belum berhasil dilakukan pada semua jenis tanaman karena beberapa masalah utama, yaitu : (1) banyak plantlet yang abnormal, (2) tanaman tidak mampu bertahan hidup, (3) tanaman mengalami nekrosis meristem akar dan berbatang lunak (4) tanaman terlambat pertumbuhannya dan penurunan sifat toleran terhadap kondisi lingkungan suboptimal selama tumbuh (5) tanaman semakin bersifat rentan terhadap mikroba (Bapat, 1993).

2.4 Eksplan Untuk Pembuatan *Artificial Seed*

Bapat *et al.* (1987) telah mencoba teknik enkapsulasi setek buku tunggal mulberry (*Morus indica* L) asal kultur jaringan untuk disimpan dan

diperbanyak secara *in vitro*. Setek buku tunggal mulberry dienkapsulasi dengan 4% natrium alginat yang mengandung media MS cair untuk menghasilkan kapsul-kapsul alginat yang berisi satu setek buku tunggal. Kapsul disimpan pada suhu dingin (4°C) selama 45 hari tanpa cahaya, kemudian ditumbuhkan pada media MS padat pada kondisi cahaya. Dalam waktu tiga minggu tunas aksilar dan akar mulberry tumbuh dan berkembang menembus matrik alginat menjadi planlet (bibit mikro) sebesar 80 persen.

Sudarmonowati dan Bachtiar (1994) menggunakan teknik enkapsulasi untuk perbanyak secara *in vitro* akasia (*Accacia mangium*). Tunas pucuk dienkapsulasi dengan 2% natrium alginat yang mengandung media MS cair, kemudian kapsul ditumbuhkan pada media MS padat yang mengandung 2 mg^l-¹ IBA dan 1 mg^l-¹ BAP. Dalam waktu dua minggu tunas dalam kapsul tumbuh sebesar 80 persen.

Ganapathi, *et al.* (1992); (1994), menggunakan tunas pucuk cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) yang dienkapsulasi dengan 3 % natrium alginat. Kemudian kapsul ditumbuhkan pada media White padat secara *in vitro*. Dalam waktu seminggu hampir 100 % tunas pucuk mulai tumbuh. Tunas dan akar menembus matriks alginat dan menjadi planlet (bibit mikro) dalam waktu enam minggu. Bibit mikro ini ditumbuhkan dalam pot plastik berisi campuran tanah dan kompos steril dan dipelihara pada lingkungan rumah kaca, setelah tiga bulan tanaman dapat dipindahkan ke lapang.

Penelitian kryopreservasi embryo kakao oleh Fang *et al.* (2003) dilakukan dengan enkapsulasi embrio somatik fase kotiledon kakao menggunakan 3 % asam alginat. Kapsul kemudian diprekultur dalam media ED ditambah sukrosa atau ABA dengan durasi pengeringan 4 jam. Keberhasilan hidup embrio tertinggi *artificial seed* kakao setelah kryopreservasi sebesar 40 persen.

2.5 Biaya Pembuatan Bahan Tanam Kakao

Perbanyakan kakao umumnya dilakukan secara generatif menggunakan benih hibrida dan secara vegetatif menggunakan stek, okulasi,

sambung pucuk, kultur *in vitro*. Lembaga Riset Perkebunan Indonesia menyediakan produk bahan tanam kakao yang bermutu tinggi. Harga bahan tanam kakao menurut Lembaga Riset Perkebunan Indonesia loco Jember tahun 2009 adalah sebagai berikut :

- | | | |
|---|--|------------------------|
| 1 | Kecambah kakao klonal asal somatik embriogenesis | Rp. 5.000 per kecambah |
| 2 | Benih : | |
| | a. Hibrida F1 hasil persilangan terbuka | Rp. 500 per biji |
| | b. Hibrida F1 tahan penyakit VSD | Rp. 750 per biji |
| | c. Hibrida F1 hasil persilangan buatan | Rp. 1.500 per biji |
| | d. Batang bawah asal klon DR1, DR2, DR38 | Rp. 600 per biji |
| 3 | Buah : | |
| | a. Hibrida F1 hasil persilangan terbuka | Rp. 8.000 per buah |
| | b. Hibrida F1 hasil persilangan buatan | Rp. 24.500 per buah |
| | c. Batang bawah asal klon DR1, DR2, DR38 | Rp. 9.800 per buah |
| 4 | Bibit : | |
| | a. Kakao lindak asal biji | Rp. 2.900 per batang |
| | b. Kakao lindak mulia asal okulasi/sambungan | Rp. 5.500 per batang |

2.6 Hipotesis

Berdasarkan perumusan masalah maka dapat dikemukakan beberapa hipotesis sebagai berikut :

1. Terdapat jenis eksplan yang optimal untuk pembuatan *artificial seed* hasil kultur *in vitro* kakao.
2. Terdapat konsentrasi alginat yang optimal untuk pembuatan *artificial seed* hasil kultur *in vitro* kakao.
3. Perlakuan cahaya berpengaruh terhadap kemampuan tumbuh dan ketahanan *artificial seed* kakao.
4. Terdapat satu interaksi atau lebih antara alginat, macam eksplan dan cahaya terhadap kemampuan tumbuh dan ketahanan hidup *artificial seed* kakao.
5. Penyimpanan berpengaruh terhadap kemampuan tumbuh dan ketahanan hidup *artificial seed* kakao.

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, di Jember, Jawa Timur mulai bulan Oktober 2007 sampai Juni 2008.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan tanam yang digunakan adalah (1) embrio somatik fase kotiledon hasil perbanyakan secara *in vitro* somatik embriogenesis organ bunga klon kakao Sca 6, (2) eksplan embrio zigotik belum berakar yang berasal dari *immature embryo* buah kakao klon Sca 6 umur 90-95 hari setelah dikecambahkan secara *in vitro* selama 42 hari dan (3) eksplan embrio zigotik sudah berakar yang berasal dari *immature embryo* buah kakao klon Sca 6 umur 90-95 hari setelah dikecambahkan secara *in vitro* selama 49 hari. Klon diperoleh dari Kebun Koleksi Kakao milik Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.

Bahan kimia yang digunakan terdiri dari Alginic acid-Sodium salt (Phyto Technology Laboratories USA), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Bactocyn, Benlate, formalin tablet, larutan MS, larutan B5, aquades, agar-agar, alkohol teknis 96 %, spiritus, aluminium foil, plastik *wrap*, kertas saring, kertas *tissue*, plastik anti panas, kain hitam, pasir kasar, tanah dan pupuk kandang.

Alat-alat yang digunakan adalah tabung gelas erlenmeyer 1000 ml, gelas ukur 100 ml, gelas piala, pipet volume, corong gelas, gelas pengaduk, sendok teh, cawan petri, botol *jelly*, timbangan analitik, autoklaf, laminair cabinet air flow, disetingset, desikator, lampu bunsen, rak kultur yang dilengkapi lampu *fluorescence* dengan intensitas cahaya 1000 – 2000 luks, ruang inkubasi dengan lama penyinaran 16 jam perhari, kulkas, kamera, gelas plastik, hand sprayer, dan alat tulis.

3.3 Metode Percobaan

Percobaan ini disusun dengan Rancangan Acak Lengkap Faktorial, 3 ulangan dan model tetap. Faktor pertama adalah 3 jenis eksplan yang dienkapsulasi yaitu (1) embrio somatik fase kotiledon hasil perbanyakan secara *in vitro* somatik embriogenesis kakao Sca 6 dari organ bunga (KSE), (2) eksplan embrio zigotik belum berakar hasil perkecambahan *in vitro immature embryo* buah kakao klon Sca 6 umur 90-95 hari (KE), dan (3) eksplan embrio zigotik sudah berakar hasil perkecambahan *in vitro immature embryo* buah kakao klon Sca 6 umur 90 – 95 hari (KAE). Faktor kedua adalah konsentrasi Natrium alginat dengan 4 taraf perlakuan konsentrasi yaitu : 0% (kontrol/A0), 2,25% (A1), 2,50% (A2), dan 2,75% (A3). Faktor ketiga adalah pengaruh pemberian cahaya dalam penyimpanan yaitu gelap (C0) dan kondisi terang dengan intensitas cahaya 1000 – 2000 luks (C1). Uji F dilakukan pada parameter persentase eksplan hidup, jumlah akar baru, panjang akar baru, persentase berakar baru dan pertumbuhan tunas, jika data menyebar normal. Transformasi dilakukan jika data yang diperoleh tidak menyebar normal. Apabila hasil analisis ragam berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjutan menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) 5%. Contoh transformasi data, analisis ragam dan hasil uji BNJ 5% dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.4 Pelaksanaan Percobaan

3.4.1 Sterilisasi Alat

Botol kultur, cawan petri, tabung reaksi, dan semua alat untuk pembuatan media serta alat tanam (diseksi) dicuci bersih, dikeringkan dan diautoklaf pada tekanan 1.1 kg/cm² dengan suhu 121°C selama 1 jam. Laminar air flow cabinet disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 95% pada semua dinding dan permukaannya serta lampu ultraviolet dinyalakan selama satu jam menjelang digunakan.

3.4.2 Pembuatan Media

Media B5 dan media Murashige and Skoog (MS) digunakan sebagai media dasar. Untuk memudahkan pembuatan media dibuat larutan stok dari

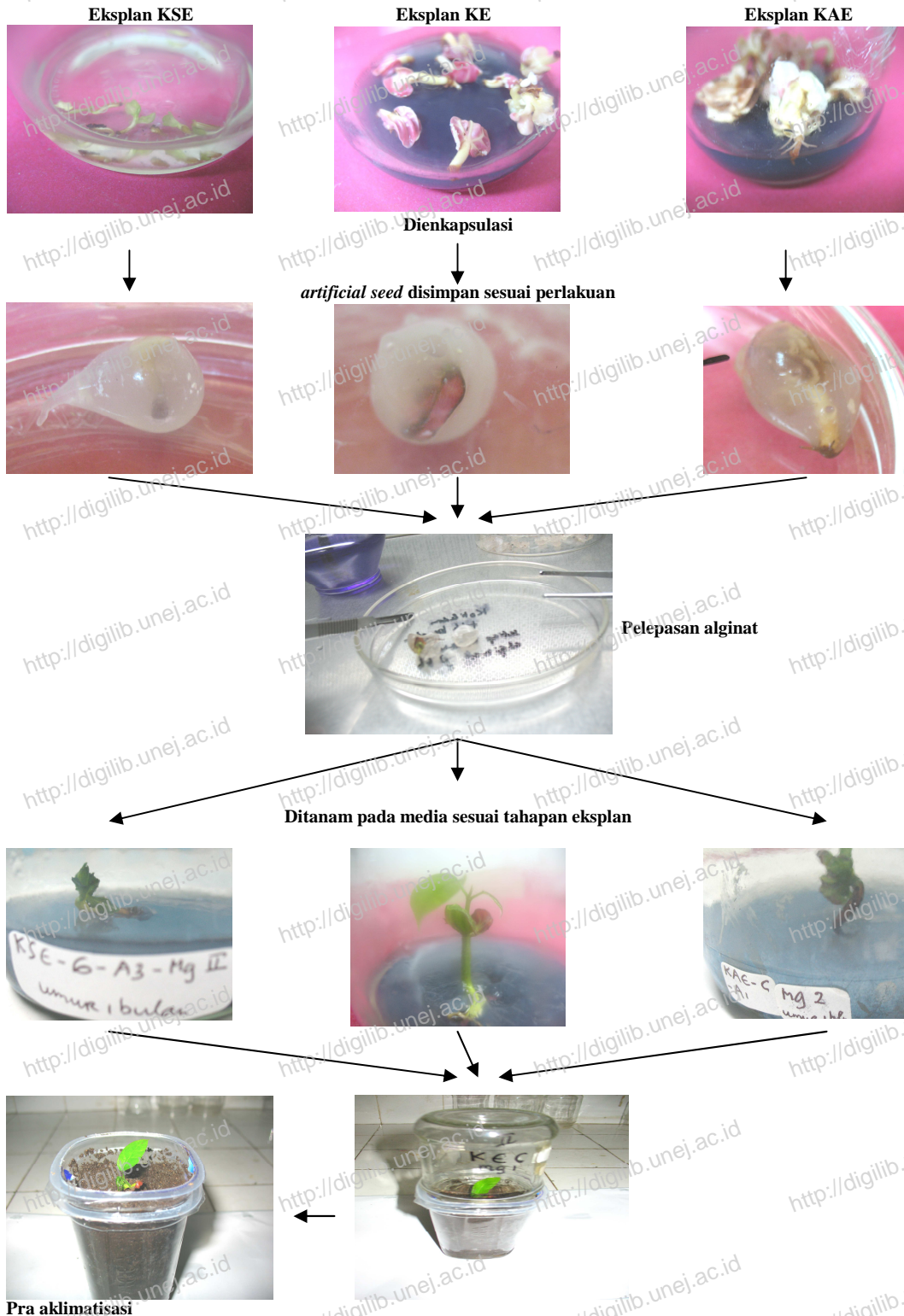
formulanya. Media dibuat dengan memipet larutan stok sesuai dengan konsentrasi yang dibutuhkan. Larutan media diukur pH-nya dan diatur sekitar 5.80 dengan menambahkan beberapa tetes HCl 1 N atau NaOH 1 N. Kemudian ditambahkan agar sebanyak 8 g/l kedalam larutan media MS dan dimasak sampai mendidih. Media kemudian dituang kedalam tiap botol kultur steril sebanyak 25 ml, ditutup dengan aluminium foil dan diautoklaf selama 20 menit pada tekanan 1.1 kg/cm² dengan suhu 121°C. Media steril disimpan dalam ruang kultur selama 3 hari sebelum digunakan.

3.4.3 Persiapan Eksplan

Eksplan yang dimaksud pada penelitian ini adalah bahan tanam untuk enkapsulasi. Tujuan tahap ini adalah untuk mendapatkan sumber bahan tanam yang akan dienkapsulasi. *Immature embryo* diisolasi dari bakal biji dari buah kakao berumur 90 - 95 hari. Sterilisasi buah muda dilakukan dengan mencelup ke dalam alkohol 96 % dilanjutkan pengupasan kulit luar. Bakal biji berpulp dicelup dengan alkohol 96 %, dibakar sampai api padam kemudian *immature embryo* diambil. *Immature embryo* ditanam dalam media dasar B5 dengan NAA 0,5 mg/l; 2iP 0,3 mg/l; charcoal 1g/l; glukosa 40g/l dan phytigel 2 g/l. Setiap botol kultur ditanami 5 *immature embryo* yang ditempatkan di ruang kultur gelap dengan suhu 26 – 28 °C selama 8 minggu. Sub kultur dilakukan setiap 3 minggu sekali dengan media yang sama.

Eksplan belum berakar (KE) dipanen setelah dikecambahkan secara *in vitro* selama 6 minggu setelah mencapai panjang kurang lebih 2 cm. Eksplan sudah berakar (KAE) dipanen setelah dikecambahkan secara *in vitro* selama 7 minggu, panjangnya kurang lebih 2,5 cm. Sumber eksplan lainnya untuk enkapsulasi adalah eksplan fase kotiledon (KSE) dengan panjang 1 cm hasil perbanyakan secara *in vitro* somatik embriogenesis klon kakao Sca 6 dari eksplan organ bunga didapat dari hasil penelitian sebelumnya (Oetami, 2009) (Gambar 4 dan Tabel 2).

Tahapan Eksplan sampai Pra Aklimatisasi



Gambar 4. Tahapan Eksplan sampai Pra Aklimatisasi

Tabel 2. Tahapan Perkembangan Eksplan Kakao Dan Media Yang Digunakan Dalam Pelaksanaan Penelitian

Tahap	Tahapan Eksplan kotiledon dari somatik embrio genesis	Media Dasar	Tahapan Eksplan belum berakar dari <i>immature embryo</i>	Media Dasar	Tahapan Eksplan berakar dari <i>immature embryo</i>	Media Dasar
1	Organ bunga	I. Inisiasi - 3minggu - MS; 2,4D 2mg/l; adenin 0,25 mg/l; Sukrosa 30g/l; phytagel 2g/l. II Induksi - 2x3 minggu - media sama dengan inisiasi tanpa ZPT. III . Multiplikasi - 3x3 minggu - MS; NAA 0,01mg/l; 2iP 0,3 mg/l; charcoal 1g/l; glukosa 40 g/l; phytagel 3 g/l	<i>Immature embryo</i> diisolasi dari bakal buah kakao umur 90-95 hari. Ukuran <i>immature embryo</i> 3-6 mm	B5; NAA 0,5 mg/l; 2iP ,0.3 mg/l; charcoal 1g/l; glukosa 40 g/l; phytagel 2g/l, selama 2x3 minggu	<i>Immature embryo</i> diisolasi dari bakal buah kakao umur 90-95 hari. Ukuran <i>immature embryo</i> 3-6 mm	B5; NAA 0,5 mg/l; 2iP, 0.3mg/l; Charcoal 1g/l; glukosa 40g/l; phytagel 2g/l, selama 7-8 minggu, interval subkultur 3 minggu
2	Kotiledon panjang 1cm (berasal dari penelitian sebelumnya)	Dienkapsulasi dg alginat, perlakuan alginat 0%, 2.25%, 2.50%, 2.75%. Pelarut alginat: MS; ABA 3 mg/l	eksplan belum berakar panjang 2 cm	Dienkapsulasi dg alginat, perlakuan alginat 0%, 2.25%, 2.50%, 2.75%. Pelarut alginat: MS; ABA 3 mg/l	eksplan berakar panjang 2,5 cm	Dienkapsulasi dg alginat, perlakuan alginat 0%, 2.25%, 2.50%, 2.75%. Pelarut alginat: MS; ABA 3mg/l
3	Kapsul kotiledon disimpan dengan, atau tanpa cahaya 1, 2, 3, 4 minggu, setelah masa simpan dilakukan pelepasan alginat yg menyaluti	Ditumbuhkan pada MS; NAA 0,01 mg/l; 2iP 0,3 mg/l; charcoa 1 g/l; glukosa 40 g/l ; agar-agar 8g/l, selama 4 minggu	Kapsul eksplan disimpan dengan, atau tanpa cahaya 1, 2, 3, 4 minggu, setelah masa simpan dilakukan pelepasan alginat yg menyaluti	Ditumbuhkan pada MS; NAA 0,01 mg/l; 2iP ,0.3 mg/l; charcoal 1 g/l; glukosa 40 g/l , agar-agar 8 g/l, selama 4 minggu	Kapsul eksplan disimpan dengan, atau tanpa cahaya 1, 2, 3, 4 minggu, setelah masa simpan dilakukan pelepasan alginat yg menyaluti	Ditumbuhkan pada MS; glukosa 10g/l; charcoal 1g/l; agar-agar 8g/l, selama 4 minggu
4	Pra Aklimatisasi	Media steril campuran tanah: pupuk kandang:pasir ; 1:1:1, selama 1 bulan	Pra Aklimatisasi. Panjang kotiledon >3 cm, daun baru sepasang, akar >0,5cm	Media steril campuran tanah: pupuk kandang:p asir; 1:1:1, selama 1 bulan	Pra Aklimatisasi. Panjang tanaman 4-6 cm, daun baru sepasang,	Media steril campuran Tanah ; pupuk kandang: pasir; 1:1:1, selama 1 bulan

3.4.4 Prosedur Enkapsulasi

Tahap kerja enkapsulasi eksplan dilakukan sebagai berikut. Pelarut alginat menggunakan larutan MS dengan ABA 3 mg/l diautoklaf selama 20 menit pada tekanan 1,1 kg/cm² dengan suhu 121°C kemudian ditambah fungisida (Benlate 0,02 g/100 ml) dan bakterisida (Bactocyn 0,01 ml/100 ml). Bubuk alginat sesuai perlakuan sebelum dipakai disterilkan dengan formalin tablet pada desikator selama 12 jam. Enkapsulasi eksplan dilakukan dengan mengambil media alginat sesuai perlakuan dengan sendok teh, satu eksplan dimasukkan pada media alginat sampai tertutupi dengan sendok teh yang lain dan untuk mengeraskannya menjadi gel kapsul, masukkan pada larutan 2 g/150 ml CaCl₂.2H₂O steril yang telah diautoklaf kemudian direndam serta digoyang pelan mengikuti gerakan dasar wadah selama 10 menit.

3.4.5 Pengemasan dan Penyimpanan *Artificial seed*.

Sebelum kapsul eksplan dikemas, kapsul direndam dalam campuran larutan fungisida (1 g/100ml Benlate) dan bakterisida (0,1 ml/100 ml Bactocyn) selama 2 menit untuk mengontrol kontaminasi. Kapsul dikemas dalam botol jely sebanyak 1 kapsul dan botol jely direkat dengan plastik wrap. Kemasan-kemasan kapsul kemudian diberi perlakuan cahaya, kondisi gelap atau kondisi terang selama 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu.

3.4.6 Pengujian Kemampuan Tumbuh dan Ketahanan Hidup.

Uji ini dilakukan dengan menumbuhkan eksplan setelah perlakuan simpan 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu, dengan melepas alginat penyalut pada kondisi suhu 25°C – 28°C, kelembaban 65 – 70%, intensitas cahaya 1000 – 2000 luks, 16 jam /hari. Pengamatan dilakukan setiap hari selama 28 hari.

Eksplan fase kotiledon hasil perbanyakan secara *in vitro* somatik embryogenesis klon kakao Sca 6 dari eksplan organ bunga dan eksplan belum berakar hasil perkecambahan *in vitro* kakao dari *immature embryo*

buah kakao klon Sca 6 umur 90 – 95 hari ditumbuhkan pada media dasar MS dengan NAA 0,01 mg/l ; 2 iP 0,3 mg/l; charcoal 1g/l ; glukosa 40g/l dan agar-agar 8 g/l. Sedangkan eksplan sudah berakar hasil perkecambahan *in vitro* kakao dari *immature embryo* buah kakao klon Sca 6 umur 90 – 95 hari ditumbuhkan pada media dasar MS dengan glukosa 10 g/l; charcoal 1 g/l; agar 8 g/l.

3.4.7 Perlakuan Kontrol (konsentrasi alginat 0%)

Perlakuan kontrol dilakukan dengan tidak mengenkapsulasi eksplan. Eksplan embrio zigotik hasil perkecambahan *in vitro* dan eksplan dari somatik embriogenesis langsung ditumbuhkan pada media tumbuh. Eksplan fase kotiledon hasil perbanyakan secara *in vitro* somatik embriogenesis klon kakao Sca 6 dari eksplan organ bunga dan eksplan belum berakar hasil perbanyakan *in vitro* kakao dari *immature embryo* buah kakao klon Sca 6 umur 90 – 95 hari ditumbuhkan pada media dasar MS dengan NAA 0,01 mg/l ; 2 iP 0,3 mg/l; charcoal 1gr/l ; glukosa 40gr/l dan agar 8 g/l. Sedangkan eksplan sudah berakar hasil perbanyakan *in vitro* kakao dari *immature embryo* buah kakao klon Sca 6 umur 90 – 95 hari ditumbuhkan pada media dasar MS dengan glukosa 10 g/l; charcoal 1 g/l; agar-agar 8 g/l.

3.5 Parameter Yang Diamati

3.5.1 Pengamatan Selama Pembuatan Dan Penyimpanan *Artificial Seed*

Pengamatan selama pembuatan dan masa penyimpanan *artificial seed* dilakukan setiap hari sesuai masa simpan 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu, dan 4 minggu terhadap :

1. Kondisi kapsul pada 3 taraf perlakuan konsentrasi alginat.

Kondisi kapsul hasil pembuatan *artificial seed*, yakni : utuh, robek, lunak, padat.

2. Pertumbuhan eksplan didalam kapsul.

Pertumbuhan eksplan sampai menembus kapsul.

3. Kapsul yang terkontaminasi (%).

Persentase kapsul yang terkontaminasi jamur dan bakteri

3.5.2 Pengamatan Terhadap Daya Tumbuh Setelah Penyimpanan

Kemampuan tumbuh dan ketahanan hidup eksplan setelah pelepasan alginat pada masa simpan 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu, 4 minggu, dan diamati setelah 28 hari ditumbuhkan pada media, melalui parameter :

1. Persentase eksplan hidup.

Jumlah eksplan hidup dibagi jumlah semua eksplan dikalikan 100

2. Jumlah akar baru.

Jumlah akar baru yang terbentuk (warna putih)

3. Panjang akar baru eksplan.

Panjang akar baru yang terbentuk (mm)

4. Persentase berakar baru.

Jumlah eksplan yang mempunyai akar baru dibagi jumlah semua eksplan dikalikan 100

5. Pertumbuhan tunas.

Panjang tunas dikurangi panjang awal eksplan (mm)

3.5.3 Pengamatan Masa Pra Aklimatisasi

Parameter pengamatan pada masa pra aklimatisasi adalah :

1. Tinggi tanaman (cm)
2. Jumlah daun
3. Panjang akar (cm)
4. Jumlah akar

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengamatan Visual Selama Pembuatan dan Penyimpanan *Artificial Seed*

Pengamatan terhadap *artificial seed* selama pembuatan sampai penyimpanan dilakukan terhadap kondisi kapsul, pertumbuhan eksplan didalam kapsul, dan kontaminasi oleh mikroorganisma.

Setiap konsentrasi alginat yang dicobakan menghasilkan *artificial seed* dengan kondisi baik seperti terlihat pada Tabel 3 dan Gambar 5.

Tabel 3. Keberhasilan Pembentukan *Artificial seed*

Na – Alginat (%)	Kapsul <i>artificial seed</i>	Kondisi
2,25 + MS	padat	eksplan dapat dibungkus
2,50 + MS	padat	eksplan dapat dibungkus
2,75 + MS	lebih padat	eksplan dapat dibungkus



Artificial seed dengan alginat 2,25 % (A1)

Artificial seed dengan alginat 2,50 % (A2)

Artificial seed dengan alginat 2,75 % (A3)

Gambar 5. Keberhasilan Pembentukan *Artificial Seed*

Penggunaan natrium alginat dengan konsentrasi 2,25 ; 2,50 dan 2,75 % sebagai bahan enkapsulasi eksplan kakao dapat membentuk *artificial seed* yang utuh, tidak robek, padat serta semua bagian eksplan terbungkus atau tersaluti natrium alginat (Tabel 3 dan Gambar 5). Menurut Siahaan (1996) kondisi *artificial seed* yang tidak utuh menyulitkan untuk dipindah, sedangkan kondisi yang terlalu padat tidak mendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Dengan demikian, penggunaan natrium alginat dengan konsentrasi yang dicobakan tidak akan mengurangi kemampuan eksplan untuk tumbuh dan berkembang.

Pada pembuatan *artificial seed* dengan menggunakan eksplan KE dan KSE, setiap 100 ml gel larutan natrium mampu membentuk sekitar 25 buah.. Sementara itu, jika eksplan yang dipergunakan KAE, setiap 100 ml gel natrium alginat mampu membentuk sekitar 20 buah. Rata-rata *artificial seed* yang diperoleh secara berurutan memiliki berat 2,07 g dengan diameter 2,25 cm; 1,32 g dengan diameter 1,75 – 2 cm dan 2,28 g dengan diameter 2,75 cm untuk *artificial seed* yang berasal dari eksplan KE, KSE dan KAE.

Selama dalam penyimpanan, kapsul *artificial seed* ternyata mengalami penurunan bobot. Diduga bobot kapsul berkurang akibat penguapan. Rerata pengurangan bobot kapsul disajikan dalam tabel 4.

Tabel 4. Pengurangan bobot Kapsul (%) Selama Masa Penyimpanan

Asal Eksplan	Masa Penyimpanan (Minggu)			
	1	2	3	4
KE	5,3	8,2	3,4	11,6
KAE	7,0	8,3	4,8	7,9
KSE	9,8	23,4	9,1	47,7

Walaupun bobot berkurang selama penyimpanan seperti pada tabel 4, namun tidak ditemukan kapsul yang mengkerut (dehidrasi berat) atau kapsul dengan keadaan melunak. Berbeda dengan apa yang dilaporkan Siahaan (1996), bahwa pada enkapsulasi bibit mikro kentang ditemukan kapsul yang mengkerut (dehidrasi berat) dan kapsul dengan keadaan melunak.

Eksplan tidak mengalami pertumbuhan hingga masa penyimpanan 4 minggu. Hal ini diyakini karena pengaruh zat pengatur tumbuh ABA yang ditambahkan pada alginat. Menurut Salisbury dan Ross (1992), ABA eksogen merupakan penghambat kuat bagi perkecambahan benih, sehingga menyebabkan dormansi. Penelitian Lestari dan Purnamaningsih (2000) menginformasikan, pemberian 5 ppm ABA mampu meningkatkan daya simpan bibit mikro daun dewa selama 7 bulan tanpa menyebabkan penurunan daya tumbuh. Sebaliknya, Siahaan (1996), melaporkan bahwa bibit mikro kentang yang dienkapsulasi tanpa ABA, mulai merobek kapsul setelah 7 hari disimpan pada kondisi cahaya dan menembus kapsul alginat setelah 10 hari.

Berdasarkan hasil pengamatan, kontaminasi pada *artificial seed* yang diakibatkan oleh bakteri tidak dijumpai, tetapi kontaminasi oleh jamur terjadi sampai 16 persen. Alginat selain berfungsi sebagai pengganti endosperm juga berperan sebagai pelindung embrio dari serangan hama dan penyakit. Untuk itu biasanya ditambahkan suatu *agent* anti mikroorganisma pada campuran penyusun selubung benih sintetik (<http://benih sintetik.blogspot.com/2008>). Bahan yang ditambahkan antara lain fungisida, bakterisida atau insektisida dengan memperhatikan tingkat fitotoksitasnya terhadap embrio.

Percobaan pendahuluan dilakukan dalam pembuatan *artificial seed* supaya tidak terinfeksi bakteri dan jamur. Hasilnya, pelarut alginat menggunakan larutan MS kemudian ditambah fungisida (Benlate 0,02 g/100ml) dan bakterisida (Bactocyn 0,01ml/100ml) dapat mengontrol kontaminasi dengan baik. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Bapat dan Rao (1990), bahwa penambahan fungisida (Carbendezam) dapat melindungi *artificial seed* dari kontaminasi.

4.2 Hasil Pengujian Daya Tumbuh Setelah Penyimpanan

Daya tumbuh atau viabilitas adalah kemampuan benih untuk hidup, yang ditunjukkan oleh gejala pertumbuhan dan gejala metabolismenya (Sadjad, 1986). Gejala pertumbuhan tersebut, seperti yang dipakai sebagai parameter percobaan ini, meliputi persentase eksplan hidup, jumlah akar baru, panjang akar baru, persentase eksplan berakar baru, dan pertumbuhan tunas. Sebelum ditumbuhkan ke media alginat penyalut *artificial seed* dilepas terlebih dahulu. Uji daya tumbuh dilakukan setelah *artificial seed* disimpan 1, 2, 3 dan 4 minggu.

Uji daya tumbuh dimaksudkan untuk mengetahui berapa lama *artificial seed* dapat disimpan, tanpa mengurangi daya tumbuh dan ketahanan hidupnya. Selain itu, juga untuk mencari konsentrasi alginat dan jenis eksplan yang optimal. Pendugaan masa simpan ini bermanfaat untuk mengantisipasi waktu yang diperlukan bagi pengiriman bibit mikro tanaman hasil kultur jaringan ketempat yang jauh (Siahaan, 1996).

4.2.1 Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup diamati pada 28 hari setelah perlakuan penyimpanan. Keberhasilan dari penyimpanan *artificial seed* ditandai dengan berkembangnya eksplan menjadi tanaman. Analisis ragam untuk data persentase eksplan hidup seperti ditampilkan pada Tabel 5.

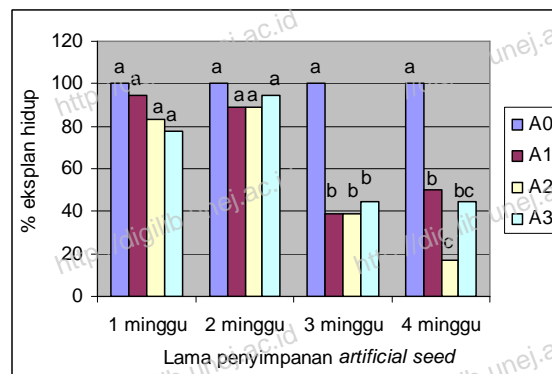
Tabel 5. Rangkuman Kuadrat Tengah Persentase Eksplan Hidup

Sumber Keragaman	db	Masa Simpan (minggu)			
		1	2	3	4
Perlakuan	23	571,65 ^{ns}	321,34 ^{ns}	2598,43 ^{**}	2637,40 ^{**}
A	3	996,06 ^{ns}	241,24 ^{ns}	8566,16 ^{**}	11653,9 ^{**}
K	2	522,93 ^{ns}	60,70 ^{ns}	7246,37 ^{**}	5901,69 ^{**}
C	1	0,00 ^{ns}	42,02 ^{ns}	1195,27 ^{ns}	1195,27 ^{ns}
A x K	6	921,36 ^{ns}	259,91 ^{ns}	2365,65 [*]	1120,57 ^{ns}
A x C	3	199,21 ^{ns}	490,24 ^{ns}	199,21 ^{ns}	597,64 ^{ns}
C x K	2	224,11 ^{ns}	546,27 ^{ns}	522,93 ^{ns}	74,70 ^{ns}
A x K x C	6	423,32 ^{ns}	396,84 ^{ns}	423,32 ^{ns}	672,344 ^{ns}
Gallat	48	522,93	378,19	747,04	747,04

Keterangan

- ns : non significant (tidak berbeda nyata) A : Perlakuan alginat
 * : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 95% K : Perlakuan Macam eksplan
 ** : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 99% C : Perlakuan Cahaya

Hingga masa penyimpanan 2 minggu, perlakuan konsentrasi alginat tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap persentase eksplan hidup. Perlakuan konsentrasi alginat baru memberikan pengaruh yang nyata pada penyimpanan 3 dan 4 minggu. Uji lanjutan dengan uji Beda Nyata Jujur persentase eksplan hidup ditampilkan pada Gambar 6.

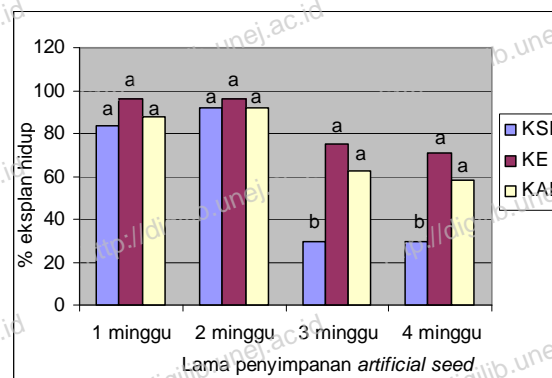


Keterangan : Histogram dengan huruf yang sama berbeda tidak nyata (BNJ 5%)

Gambar 6. Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap Persentase Eksplan Hidup

Pengaruh konsentrasi alginat sebagai bahan enkapsulasi terhadap persentase eksplan hidup *artificial seed* secara nyata terjadi pada masa penyimpanan 4 minggu. Perlakuan kontrol, memiliki eksplan hidup tertinggi, yakni 100 persen, dibanding perlakuan alginat A1; A2 dan A3, yaitu secara berurutan 50; 16,67 dan 44,44 persen.

Eksplan yang dipergunakan untuk bahan *artificial seed* memberikan respon yang berbeda terhadap persentase eksplan hidup, seperti ditampilkan pada tabel 5. Perlakuan macam eksplan memberikan pengaruh yang nyata pada masa penyimpanan 3 dan 4 minggu. Uji lanjutan yang dilakukan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada Gambar 7.

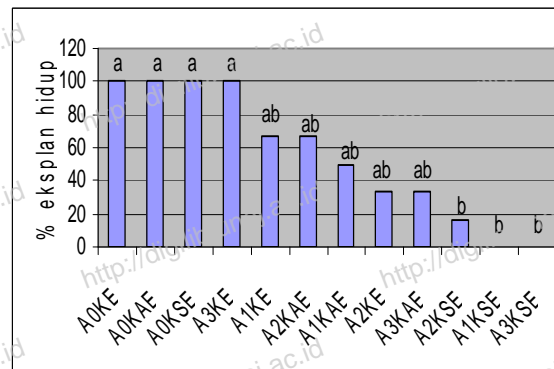


Gambar 7. Pengaruh macam eksplan terhadap persentase eksplan hidup. Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut BNJ 5%, pada minggu yang sama.

Penggunaan jenis eksplan sebagai bahan pembuatan *artificial seed* memberikan perbedaan yang nyata terhadap persentase eksplan hidup pada penyimpanan 4 minggu dengan rata-rata persentase hidup eksplan KE, KAE dan KSE secara berurutan yaitu 70,83; 58,33 dan 29,17 persen. Dengan demikian eksplan KE dan eksplan KAE memiliki persentase eksplan hidup lebih tinggi sampai penyimpanan 4 minggu (Gambar 7).

Berdasarkan analisis ragam pada tabel 5, dari data pengamatan penyimpanan *artificial seed* 3 minggu, tampak interaksi antara macam eksplan (K) dengan perlakuan konsentrasi alginat (A) yang menyalutinya

terhadap persentase eksplan hidup. Gambar 8 menampilkan hasil analisis lanjutan interaksi antara macam eksplan dan konsentrasi alginat.



Gambar 8. Interaksi Alginat Dengan Eksplan Pada Penyimpanan *Artificial Seed* Histogram dengan huruf yang sama berbeda tidak nyata (BNJ 5%)

Gambar 8 menunjukkan, interaksi perlakuan konsentrasi alginat 2,75 % (A3) dengan perlakuan eksplan kecambah kakao yang belum berakar (KE), memiliki persentase eksplan hidup yang tidak berbeda nyata dengan kontrol. Eksplan KE mampu bertahan hidup selama 3 minggu, diduga, karena secara morfologi mirip dengan embrio dalam benih konvensional, yakni belum berakar. Konsentrasi alginat 2,75 % membentuk kapsul lebih padat, utuh, tidak robek dan membungkus semua bagian eksplan, membuat metabolismenya relatif terbatas, sehingga mampu bertahan lebih lama. Dengan demikian kombinasi perlakuan A3KE hingga penyimpanan 3 minggu merupakan *artificial seed* terbaik.

Pada penyimpanan 3 dan 4 minggu, persentase hidup *artificial seed* dengan eksplan KSE hanya 29,17 persen. Eksplan KSE tidak mampu bertahan hidup lama, diduga karena dipengaruhi oleh lingkungan anaerobik dalam kapsul, karena eksplan dalam kapsul tetap aktif melakukan respirasi (Rao dan Singh, 1991), sedangkan kondisi di dalam kapsul miskin akan pertukaran gas (Redenbaugh, *et al.*, 1991). Siahaan (1996) menyampaikan, persentase hidup bibit mikro kentang setelah disimpan dalam kondisi gelap, dengan suhu 25-27 °C selama 3 dan 5 hari sebesar 28,1 dan 14,5 persen. Dengan demikian enkapsulasi eksplan kakao hasil kultur *in vitro* lebih tahan disimpan dari pada bibit mikro tanaman kentang.

4.2.2 Jumlah Akar Baru

Eksplan KAE sudah mempunyai akar sebelum dienkapsulasi, sedangkan eksplan KE mempunyai primordia akar 1-2 mm. Analisis ragam untuk data jumlah akar baru seperti ditampilkan pada Tabel 6. Uji lanjut yang dilakukan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada Gambar 9.

Tabel 6. Rangkuman Kuadrat Tengah Jumlah Akar Baru

SK	db	Masa Simpan (minggu)			
		1	2	3	4
Perlakuan	23	0,33**	0,33**	0,33**	0,30**
A	3	0,68**	0,76**	0,71**	1,49**
K	2	1,46**	1,80**	1,48**	0,52**
C	1	0,01 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,02 ^{ns}
A x K	6	0,15 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,06 ^{ns}
A x C	3	0,29 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,12 ^{ns}
C x K	2	0,01 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,00 ^{ns}
A x K x C	6	0,12 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,10 ^{ns}
Gallat	48	0,12	0,13	0,11	0,05

Keterangan :

ns : non significant (tidak berbeda nyata)

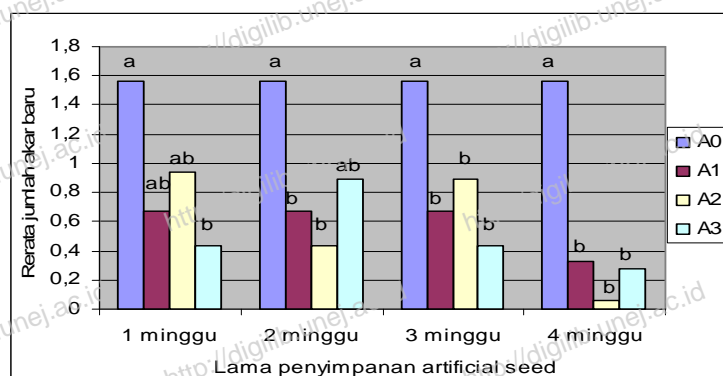
* : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 95%

** : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 99%

A : Perlakuan alginat

K : Perlakuan Macam eksplan

C : Perlakuan Cahaya



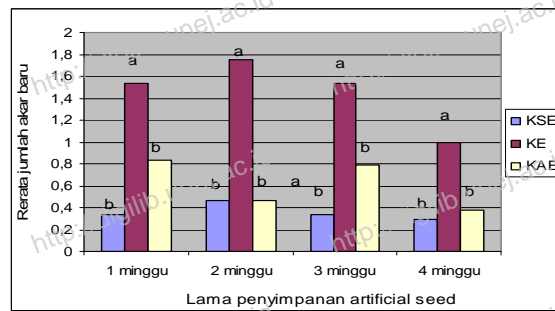
Keterangan :Histogram dengan huruf yang sama berbeda tidak nyata (BNJ 5 %)

Gambar 9. Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap Jumlah Akar Baru

Jumlah akar baru setelah penyimpanan 2 minggu untuk perlakuan alginat A3, menunjukkan perbedaan tidak nyata dengan kontrol. Dengan demikian, konsentrasi alginat terbaik sampai penyimpanan 2 minggu adalah

2,75 % (Gambar 9). Selanjutnya, penyimpanan 3 dan 4 minggu menyebabkan jumlah akar lebih kecil dibandingkan kontrol.

Eksplan yang dipergunakan dan responnya terhadap jumlah akar baru, seperti ditampilkan pada tabel 6, berbeda nyata. Uji lanjutan yang dilakukan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada gambar 10.



Gambar 10. Pengaruh Macam Eksplan Terhadap Jumlah Akar Baru. Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata (BNJ 5%)

Eksplan KE yaitu eksplan belum berakar hasil perkecambahan *in vitro* yang berasal dari *immature embryo* buah kakao umur 90-95 hari, mempunyai rerata tertinggi jumlah akar baru (gambar 10). Hal ini disebabkan eksplan KE mempunyai organ fisiologi yang sempurna, sehingga mampu bertahan dalam kapsul dengan memanfaatkan cadangan dalam tubuhnya dan endosperma pengganti yaitu MS_0 yang berada dalam alginat. Saat alginat dilepas kemudian ditumbuhkan pada media MS_0 ; NAA 0,01 mg/l; 2iP 0,3 mg/l; charcoal 1g/l; agar-agar 8 g/l dan glukosa 40 g/l, eksplan KE memanfaatkan glukosa dalam media sebagai sumber energi pertumbuhan dan perkembangan dengan zat pengatur tumbuh auksin (NAA) berperan fisiologis mendorong perpanjangan sel, pembelahan sel, dan pembentukan akar (Wattimena, 1991).

Auksin secara seluler meningkatkan sintesis nukleosida, DNA, RNA, sintesis protein dan enzim, peningkatan pertukaran proton membran, serta penyerapan kalium. Dengan demikian, metabolisme semakin aktif dan bahan penyusun sel tersedia, sehingga proses pembelahan sel akan lebih efektif dan pembentukan akar juga lebih banyak (Gardner *et al.*, 1991). Proses itulah

yang membuat NAA mempunyai kemampuan untuk merubah sifat dinding sel, sehingga sel-sel ini tumbuh dan berkembang menjadi tunas dan akar.

Eksplan asal KSE tidak mengalami pertumbuhan dan perkembangan organ akar selama penyimpanan 1 dan 2 minggu dan persentase hidup berbeda tidak nyata dengan kontrol (Gambar 10). Hal ini diduga karena, pada tanaman mikro hasil perbanyakan *in vitro* jaringan vascular antara tunas dan akar belum terbentuk secara sempurna, jaringan palisade lebih kecil serta stomata belum bekerja, sehingga proses metabolisme terhambat (Wardiyati, 1998).

Pada penelitian Siahaan, (1996) mengenai enkapsulasi bibit mikro kentang (*Solanum tuberosum* L.) lama penyimpanan menyebabkan rerata jumlah akar kentang menurun. Pada penelitian ini, juga terjadi penurunan jumlah akar bibit mikro kakao pada penyimpanan 3 dan 4 minggu.

4.2.3 Panjang Akar Baru

Panjang akar baru diamati pada 28 hari setelah perlakuan penyimpanan. Analisis ragam untuk data panjang akar baru ditampilkan pada tabel 7.

Tabel 7. Rangkuman Kuadrat Tengah Panjang Akar Baru

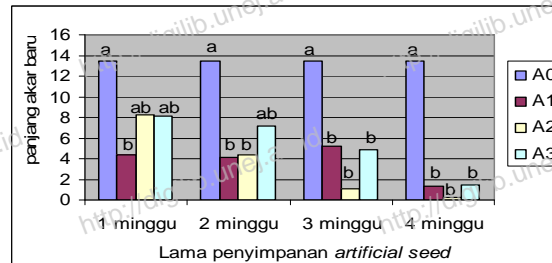
SK	db	Masa Simpan (minggu)			
		1	2	3	4
Perlakuan	23	7,87**	5,76**	5,85**	5,31**
A	3	7,70*	9,85**	14,49**	21,11**
K	2	64,13**	30,93**	17,15**	14,87**
C	1	0,00^{ns}	1,40^{ns}	16,34**	0,57^{ns}
A x K	6	1,31^{ns}	1,94^{ns}	3,32^{ns}	2,31^{ns}
A x C	3	2,34^{ns}	1,91^{ns}	0,56^{ns}	1,83^{ns}
C x K	2	0,20^{ns}	0,28^{ns}	3,48^{ns}	0,32^{ns}
A x K x C	6	2,41^{ns}	3,63^{ns}	1,98^{ns}	1,39^{ns}
Gallat	48	2,46	2,26	1,99	0,83

Keterangan :

ns : non significant (tidak berbeda nyata)
 * : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 95%
 ** : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 99%

A : Perlakuan alginat
 K : Perlakuan Macam eksplan
 C : Perlakuan Cahaya

Perlakuan konsentrasi alginat memberikan pengaruh yang nyata pada penyimpanan 1, 2, 3 dan 4 minggu. Uji lanjutan yang dilakukan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada Gambar 11.

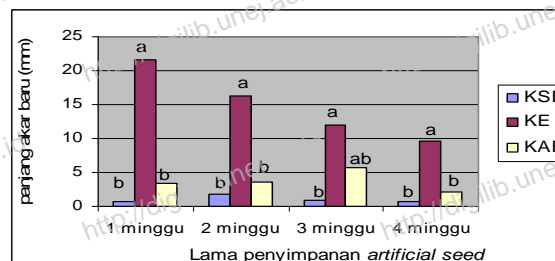


Gambar 11. Pengaruh konsentrasi alginat terhadap panjang akar baru. Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut BNJ 5%, pada minggu yang sama.

Pemberian alginat menunjukkan perbedaan panjang akar baru tidak nyata terhadap kontrol untuk penyimpanan 1 minggu. Demikian juga, *artificial seed* setelah penyimpanan 2 minggu untuk konsentrasi alginat 2,75 % menunjukkan perbedaan tidak nyata dengan kontrol. Dengan demikian konsentrasi alginat terbaik sampai penyimpanan 2 minggu adalah 2,75 % (Gambar 11).

Penurunan panjang akar yang terjadi pada *artificial seed* yang disimpan, dipengaruhi oleh lingkungan anaerobik dalam kapsul sedangkan eksplan dalam alginat tetap aktif melakukan respirasi (Rao dan Singh, 1991).

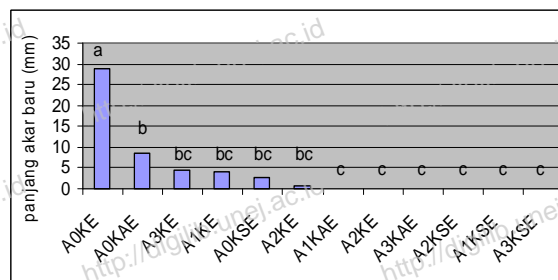
Eksplan yang dipergunakan menunjukkan respon yang berbeda terhadap panjang akar baru (tabel 7). Uji lanjut yang dilakukan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada Gambar 12.



Gambar 12. Pengaruh macam eksplan terhadap panjang akar baru. Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut BNJ 5%, pada minggu yang sama.

Panjang akar baru *artificial seed* yang berasal dari eksplan KE, KAE dan KSE masing-masing yaitu 21,54 mm, 3,42 mm dan 0,71 mm. Panjang akar baru *artificial seed* penyimpanan 2 minggu untuk eksplan KE, KAE dan KSE masing-masing yaitu 16,33 mm, 3,58 mm dan 1,83 mm. Panjang akar baru *artificial seed* setelah penyimpanan 3 minggu eksplan KE (12.00 mm), eksplan KAE (5.63 mm) dan eksplan KSE (0.88 mm). Eksplan yang menunjukkan panjang akar baru tertinggi sampai penyimpanan 4 minggu adalah eksplan KE (Gambar 12).

Hingga penyimpanan *artificial seed* 4 minggu rata-rata panjang akar baru tertinggi terjadi pada eksplan KE. Dari analisis ragam pada penyimpanan *artificial seed* 4 minggu (tabel 7), nampak interaksi antara macam eksplan dengan konsentrasi alginat terhadap rerata panjang akar baru. Analisis lanjutan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada gambar 13.



Gambar 13. Interaksi alginat dengan eksplan pada penyimpanan *artificial seed* 4 minggu. Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut BNJ 5 persen.

Perlakuan alginat 2,75% (A3) pada eksplan KE menghasilkan panjang akar baru 4,50 mm. Perlakuan dengan kombinasi A3KE memiliki panjang akar baru tertinggi dibandingkan kombinasi perlakuan yang lain tetapi lebih kecil daripada eksplan KE kontrol. Eksplan KAE kontrol memiliki panjang akar baru 8,66 mm. Sedangkan kombinasi perlakuan A1KE menghasilkan panjang akar 4,17 mm (Gambar 13). Penyimpanan *artificial seed* selama 4 minggu mengakibatkan banyak eksplan dalam alginat yang tidak bertahan. Kombinasi perlakuan terbaik selain kontrol

adalah A3KE dengan panjang akar baru 4,50 mm hingga penyimpanan *artificial seed* 4 minggu.

4.2.4 Persentase Eksplan Berakar Baru

Analisis ragam untuk data panjang akar baru ditampilkan pada tabel 8. Uji lanjut yang dilakukan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada Gambar 14.

Tabel 8. Rangkuman Kuadrat Tengah Persentase Eksplan Berakar Baru

SK	db	Masa Simpan (minggu)			
		1	2	3	4
Perlakuan	23	7,36**	4,82**	5,89**	6,75**
A	3	15,67**	17,81**	26,71**	30,63**
K	2	50,04**	19,73**	15,31**	18,55**
C	1	0,65 ^{ns}	0,63 ^{ns}	7,65*	0,11 ^{ns}
A x K	6	1,20 ^{ns}	0,83 ^{ns}	2,16 ^{ns}	1,72 ^{ns}
A x C	3	1,77 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,23 ^{ns}	1,39 ^{ns}
C x K	2	2,50 ^{ns}	2,13 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,91 ^{ns}
A x K x C	6	0,67 ^{ns}	1,32 ^{ns}	0,29 ^{ns}	1,63 ^{ns}
Gallat	48	2,35	2,01	1,19	1,34

Keterangan :

ns : non significant (tidak berbeda nyata)

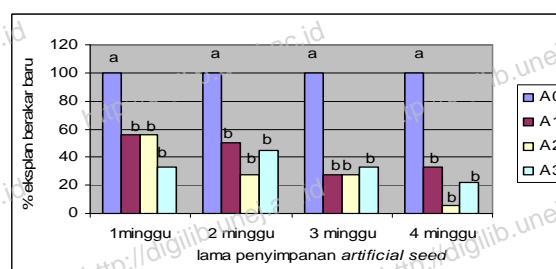
* : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 95%

** : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 99%

A : Perlakuan alginat

K : Perlakuan Macam eksplan

C : Perlakuan Cahaya

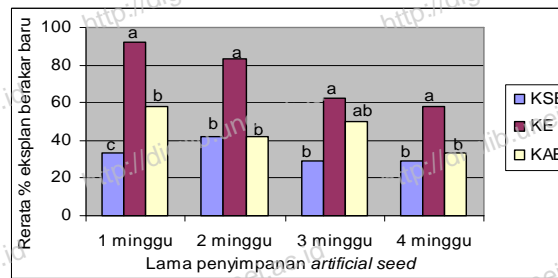


Gambar 14. Pengaruh konsentrasi alginat terhadap persentase berakar baru. Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut BNJ 5%, pada minggu yang sama.

Pada Gambar 14 terlihat persentase berakar baru *artificial seed* setelah penyimpanan 2 minggu untuk perlakuan alginat secara berurutan 100; 50,00; 27,78 dan 44,44 persen. Persentase berakar baru *artificial seed*

setelah penyimpanan 4 minggu secara berurutan 33,33; 5,56 dan 22,22 persen. Semakin lama disimpan terjadi penurunan persentase berakar baru dari eksplan akibat penyimpanan (Gambar 14).

Eksplan yang dipergunakan menyebabkan persentase berakar baru yang berbeda (tabel 8). Uji lanjutan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada gambar 15.

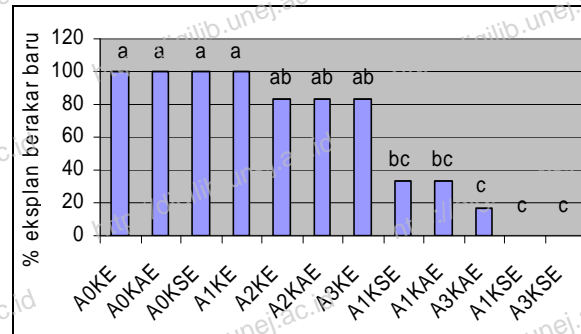


Gambar 15. Pengaruh macam eksplan terhadap persentase berakar baru. Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut BNJ 5%, pada minggu yang sama.

Eksplan KE memiliki rata-rata persentase berakar baru tertinggi pada penyimpanan *artificial seed* 2 minggu dan 4 minggu. Presentase berakar baru setelah penyimpanan 2 minggu untuk perlakuan eksplan KE, KAE dan KSE secara berurutan yaitu 83,33; 41,67 dan 41,67 persen. Pada penyimpanan 4 minggu untuk perlakuan eksplan KE, KAE dan KSE secara berurutan 58,33; 33,33 dan 29,17 persen. Semakin lama disimpan, persentase berakar baru semakin menurun. Dengan demikian eksplan yang menunjukkan persentase berakar baru tertinggi selama penyimpanan hingga 4 minggu adalah eksplan KE (Gambar 15).

Gambar 15 menunjukkan, dalam masa penyimpanan 1, 2, 3 dan 4 minggu, eksplan KAE tidak berbeda nyata dengan eksplan KE dalam pertumbuhan, perkembangan organ akar dan persentase eksplan hidup. Hal ini kemungkinan karena akar eksplan KAE banyak yang rusak pada saat pelepasan alginat sehingga memerlukan waktu lebih lama untuk proses pertumbuhan dan perkembangan organ akar yang baru.

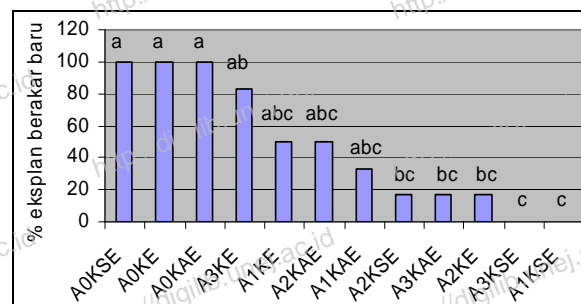
Interaksi antara macam eksplan (K) dengan perlakuan konsentrasi alginat (A) terhadap rata-rata persentase berakar baru ditampilkan pada Gambar 16.



Gambar 16. Interaksi alginat dengan eksplan pada penyimpanan 1 minggu. Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut BNJ 5 persen.

Interaksi antara jenis eksplan dengan konsentrasi alginat terjadi pada penyimpanan 1 minggu. Persentase berakar baru dari *artificial seed* yang dibentuk dari eksplan KE dengan alginat pada berbagai konsentrasi yaitu 100; 83,33 dan 83,33 persen. Perlakuan kombinasi eksplan kecambah kakao yang belum berakar (KE) dengan konsentrasi alginat 2,25% menghasilkan plantet berakar baru 100 % (Gambar 16). Konsentrasi alginat 2,25 % menghasilkan persentase hidup 94,44 % dan jumlah akar baru 0,67 %. Kombinasi terbaik untuk *artificial seed* terhadap persentase eksplan berakar baru adalah A1KE.

Interaksi antara macam eksplan (K) dengan perlakuan konsentrasi alginat (A) terhadap rerata persentase berakar baru pada minggu ke-3 tampak pada tabel 8. Analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (Gambar 17).



Gambar 17. Interaksi Alginat Dengan Eksplan Pada Penyimpanan 3 Minggu

Kombinasi A3KE (83,33%) berbeda tidak nyata terhadap kontrol (100%) untuk parameter persentase berakar baru pada penyimpanan 3 minggu (Gambar 17). Hal ini disebabkan alginat 2,75 % (A3) dapat menghasilkan kapsul yang lebih padat sehingga tidak menyebabkan dehidrasi. Dengan demikian perlakuan A3KE merupakan kombinasi perlakuan terbaik hingga penyimpanan 3 minggu.

4.2.5 Pertumbuhan Tunas

Analisis ragam untuk data pertumbuhan tunas ditampilkan pada tabel 9. Uji lanjut yang dilakukan dengan uji Beda Nyata Jujur ditampilkan pada Gambar 18.

Tabel 9. Rangkuman Kuadrat Tengah Persentase Pertumbuhan Tunas

SK	db	Masa Simpan (minggu)			
		1	2	3	4
Perlakuan	23	7,36**	4,82**	5,89**	6,75**
A	3	15,67**	17,81**	26,71**	30,63**
K	2	50,04**	19,73**	15,31**	18,55**
C	1	0,65 ^{ns}	0,63 ^{ns}	7,65*	0,11 ^{ns}
A x K	6	1,20 ^{ns}	0,83 ^{ns}	2,16 ^{ns}	1,72 ^{ns}
A x C	3	1,77 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,23 ^{ns}	1,39 ^{ns}
C x K	2	2,50 ^{ns}	2,13 ^{ns}	0,81 ^{ns}	0,91 ^{ns}
A x K x C	6	0,67 ^{ns}	1,32 ^{ns}	0,29 ^{ns}	1,63 ^{ns}
Gallat	48	2,35	2,01	1,19	1,34

Keterangan :

ns : non significant (tidak berbeda nyata)

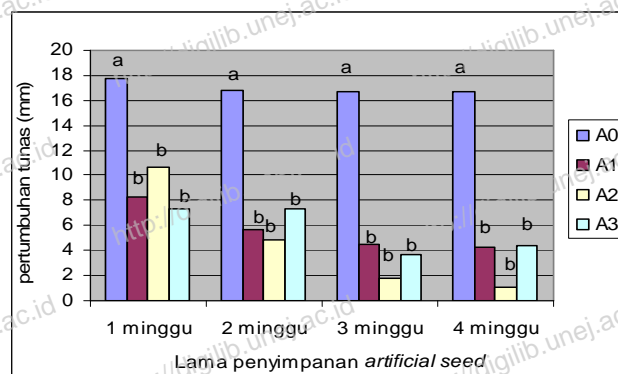
* : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 95%

** : berbeda nyata dengan taraf kepercayaan 99%

A : Perlakuan alginat

K : Perlakuan Macam ekspian

C : Perlakuan Cahaya



Gambar 18. Pengaruh Konsentrasi Alginat Terhadap Pertumbuhan Tunas

Perlakuan kontrol menunjukkan rata-rata pertumbuhan tunas tertinggi yaitu 17,72 mm. Pada penyimpanan 1 minggu pemakaian alginat 2,25%, 2,50% dan 2,75% menghasilkan rata-rata pertumbuhan tunas berturut-turut yaitu 8,28; 10,67 dan 7,28 mm. Pada penyimpanan 2 minggu masing-masing 5,72; 4,89 dan 7,33 mm. Pada penyimpanan 3 minggu masing-masing 4,44; 1,83 dan A3 3,72 mm. Pada penyimpanan 4 minggu masing-masing 4,28; 1,06 dan 4,39 mm. Pertumbuhan tunas semakin turun dengan semakin lamanya. Penggunaan alginat dengan konsentrasi 2,75% menghasilkan rata-rata pertumbuhan tunas tertinggi dibandingkan dengan dua perlakuan lainnya (Gambar 18).

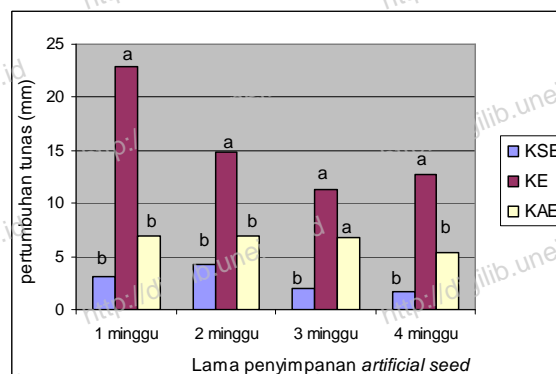
Sumber eksplan yang dipergunakan mempengaruhi pertumbuhan tunas, seperti yang tercantum pada tabel 10. Gambaran lebih jelas dalam bentuk grafik histogram ada pada gambar 19.

Tabel 10. Pertumbuhan Tunas (mm) Selama Masa Penyimpanan

Asal Eksplan	Masa Penyimpanan (Minggu)			
	1	2	3	4
KE	22,88 ^a	14,88 ^a	11,25 ^a	12,71 ^a
KAE	6,96 ^b	6,92 ^b	6,83 ^b	5,42 ^b
KSE	3,13 ^b	4,29 ^b	1,96 ^b	1,71 ^b

Keterangan : Angka yang diikuti dengan huruf yang sama berbeda tidak nyata menurut BNJ 5%,

Dalam tabel 10 nampak, eksplan KE memiliki pertumbuhan tunas terbaik sejak masa penyimpanan 1 hingga 4 minggu.

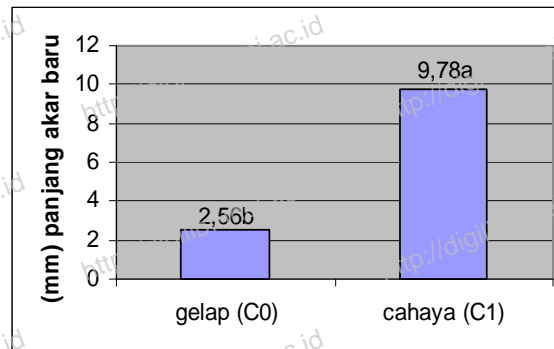


Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata (BNJ 5%)

Gambar 19. Pengaruh Macam Eksplan Terhadap Pertumbuhan Tunas

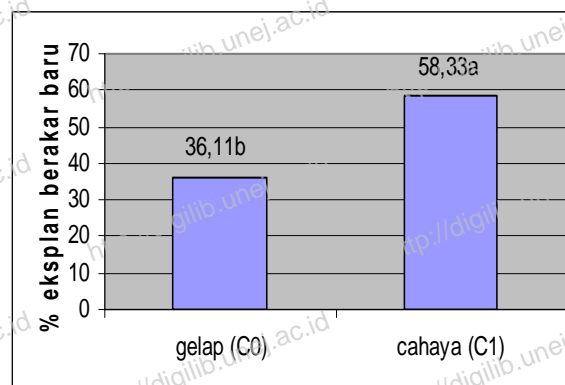
4.2.6 Pengaruh Cahaya Terhadap Penyimpanan *Artificial Seed*

Perlakuan cahaya berpengaruh nyata terhadap panjang akar baru, persentase berakar baru dan pertumbuhan tunas pada penyimpanan *artificial seed* 3 minggu. Selanjutnya dilakukan uji Beda Nyata Jujur seperti terlihat pada gambar histogram 20, 21 dan 22.



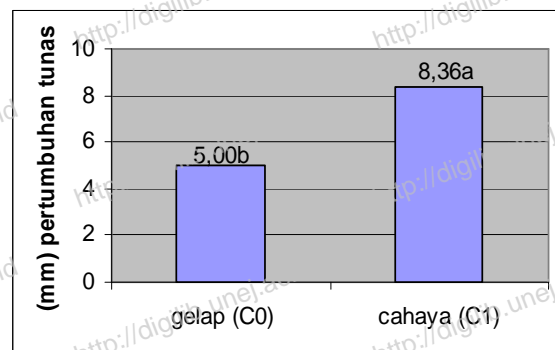
Keterangan : Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata (BNJ 5 %)

Gambar 20. Pengaruh cahaya terhadap panjang akar baru



Keterangan : Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata (BNJ 5 %)

Gambar 21. Pengaruh Cahaya Terhadap Persentase Berakar Baru



Keterangan : Histogram dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata (BNJ 5 %)

Gambar 22. Pengaruh Cahaya Terhadap Pertumbuhan Tunas

Pada Gambar 20, 21 dan 22 terlihat bahwa pemberian cahaya berpengaruh positif terhadap panjang akar baru, persentase berakar baru dan pertumbuhan tunas. Menurut Copeland dan Mc.Donald (1985), proses pengaruh cahaya terhadap perkecambahan adalah reaksi fotokhemi dari molekul-molekul pigmen, bila mendapat unsur cahaya pigmen-pigmen itu berfungsi untuk memindahkan energi dalam metabolisme. Dengan metabolisme yang aktif eksplan dapat mempertahankan hidup dan menjalankan proses pertumbuhan didalam kapsul. Lingkungan anaerobik dalam kapsul selama 3 minggu yang mendorong penggunaan cahaya oleh eksplan dalam mempertahankan hidupnya.

Parameter persentase eksplan hidup, persentase eksplan berakar baru menunjukkan adanya interaksi antara eksplan dengan alginat pada penyimpanan *artificial seed* 3 minggu dan 4 minggu untuk parameter panjang akar baru. Konsentrasi alginat 2,75 % dan eksplan KE memberikan hasil 100% eksplan yang hidup dan 83,33% berakar baru yang berbeda tidak nyata dengan kontrol. Kombinasi perlakuan alginat 2,75% (A3) dengan eksplan KE menghasilkan rata-rata panjang akar baru 4,50 mm, lebih tinggi dari pengaruh faktor tunggal konsentrasi alginat pada penyimpanan *artificial seed* 4 minggu. Penggunaan alginat dengan konsentrasi 2,75% (A3) juga memberikan rata-rata tertinggi pertumbuhan tunas dibandingkan konsentrasi 2,25% dan 2,50% pada penyimpanan *artificial seed* 4 minggu.

Eksplan KE yaitu eksplan belum berakar hasil perkecambahan secara *in vitro immature embryo* buah kakao umur 90-95 memiliki nilai rata-rata tertinggi persentase eksplan hidup, jumlah akar baru, panjang akar baru, persentase berakar baru dan pertumbuhan tunas pada penyimpanan *artificial seed* sampai 4 minggu.

Pemberian cahaya menyebabkan pertumbuhan tunas, persentase berakar baru dan panjang akar baru lebih tinggi dibandingkan tanpa cahaya sampai penyimpanan *artificial seed* 3 minggu.

4.3 Pra Aklimatisasi

Sistim enkapsulasi yang telah berhasil diterapkan untuk menghasilkan *artificial seed* hasil kultur *in vitro* dibawah kondisi terkontrol, akhirnya harus dapat disampaikan pada lingkungan *grennhouse* atau rumah bebas serangga atau di lapang. Enkapsulasi kotiledon tanaman *Rotula aquatica* Lour mempunyai prosentase hidup 55 persen sampai di lahan dengan kondisi morfologi identik dengan induknya (Chithra *et al.*, 2004). Tidak banyak laporan penelitian mengenai teknik enkapsulasi tanaman kakao hingga aplikasi di lapang. Oleh karena itu, pada penelitian ini menguji kemampuan tumbuh bibit mikro kakao bila ditumbuhkan pada media tanah dalam kondisi ruang inkubasi laboratorium kultur jaringan.

Bibit mikro kakao dikeluarkan dari botol kultur, dicuci dengan air, direndam dalam larutan fungisida Dithane 0,1% selama 3 menit, kemudian dipindahkan ke media steril campuran tanah, pasir, dan pupuk kandang (1:1:1). Bibit mikro kakao yang dipindahkan adalah bibit yang vigor, mempunyai 2 daun baru, mempunyai akar dan tinggi tanaman >3cm. Jumlah bibit mikro kakao yang layak dipindah sebanyak 27 bibit, ditumbuhkan diruang inkubasi suhu 26-28° C, cahaya 1000-2000 lux dengan 16 jam/hari, kelembaban 70 persen.

Hasil pengamatan setelah satu bulan pra aklimatisasi, ada 18 bibit mati terkontaminasi jamur, sehingga tersisa 9 bibit yang masih hidup. Serangan jamur pada bibit mikro kakao dimulai dari media campuran tanah, pupuk kandang, dan pasir, yang akhirnya bibit mati. Hal ini kemungkinan disebabkan inokulasi dari udara, karena media sudah disterilkan dan ada kontaminasi pada media kultur di rak sebelah.

Data pra aklimatisasi disajikan dalam tabel 11, 12, dan 13. Namun, hasil pengamatan tersebut belum bisa dijadikan dasar penarikan kesimpulan sebab jumlah populasinya terlalu sedikit (9 bibit) dan tidak diolah dengan statistik.

Tabel 11. Jumlah Eksplan Yang Menjadi Bibit Mikro (awal 84 eksplan)

Asal Eksplan	Masa Penyimpanan (Minggu)				
	0 (kontrol)	1	2	3	4
KE	1	3	3	1	1
KAE	0	0	0	0	0
KSE	0	0	0	0	0

Tabel 12. Bibit Mikro Kakao Yang Hidup Setelah 1 Bulan Pra Aklimatisasi

Konsentrasi Alginat (%)	Masa Penyimpanan (Minggu)				
	0 (kontrol)	1	2	3	4
0	36	1	-	-	-
2,25 (A1)	72	-	2	1	1
2,50 (A2)	72	-	0	1	0
2.75 (A3)	72	-	1	1	0

Tabel 13. Parameter Pra Aklimatisasi *Artificial Seed* Eksplan KE

Parameter	Masa Penyimpanan (Minggu)				
	0 (kontrol)	1	2	3	4
Tinggi Tanaman (cm)	5	5,83	5,5	3,5	4,5
Jumlah Daun	2	2,67	2,0	2	2
Panjang Akar (cm)	5,5	3,17	7,17	8	2,7
Jumlah Akar	4	2,67	3,33	4	3

Ket : Data diperoleh setelah 28 hari di media MS dan 1 bulan pra aklimatisasi

Serangan jamur pada bibit mikro kakao dimulai dari media campuran tanah, pupuk kandang, dan pasir yang akhirnya bibit mati. Hal ini kemungkinan disebabkan inokulasi dari udara, karena media sudah disterilkan autoklaf suhu 121°C tekanan 1,1 bar selama 1 jam dan ada kontaminasi pada media kultur di rak sebelah.

Jenis eksplan yang mempunyai kemampuan tumbuh dan hidup serta berkembang sampai pra aklimatisasi adalah eksplan KE, yaitu eksplan yang berasal dari *immature embryo* belum berakar buah kakao umur 90-95 hari. Hal ini nampak pada semua parameter/organ tanaman secara lengkap berkembang aktif dan mampu beradaptasi dengan lingkungan (media) baru.

Tabel 11 menunjukkan konsentrasi alginat 2,25 % (A1) memberikan kemampuan tumbuh dan hidup pada eksplan lebih baik daripada konsentrasi 2,50 % (A2), 2,75 % (A3). Konsentrasi alginat 2,25% membuat kapsul padat dan tidak terlalu keras tetapi dapat membungkus eksplan dengan sempurna sehingga mendukung pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

4.4 Analisa Biaya Pembuatan *Artificial Seed*

Penggunaan teknologi baru di bidang teknologi benih / pembuatan *artificial seed* dalam aplikasinya dipengaruhi oleh efisiensi biaya. Analisa biaya yang diperlukan dapat dilihat pada tabel 14.

Tabel 14. Analisa Biaya *Artificial Seed* Asal Eksplan KE

Nama Bahan	Volume	Harga Bahan (Rp/Satuan Bahan)	Biaya (Rp.)
Kolven Kakao (isi 25-30 biji)	1 buah	9.000	9.000
Natrium Alginat	2,75 g	522.000/100 g	14.355
Media MS (untuk menumbuhkan eksplan)	5 btl jely media	25.000/ 40 botol	3.125
Larutan MS + ZPT (untuk bahan enkapsulasi)	100 ml	25.000/ 1000 ml	2.500
Aquadest	1 lt	2.400	2.400
CaCl ₂ .2H ₂ O	2 g	699.000/250 g	5.592
Fungisida Benlate	0,02 g	85.000/250 g	7
Bakterisida Bactomycin	0,01 ml	50.000/100 ml	5
Alkohol 96%	200 ml	24.000/1000 ml	4.800
Spiritus	200 ml	13.000/1000 ml	2.600
Botol Jely + Tutup	5 buah	500/botol	2.500
Total <i>Artificial Seed</i>	25 buah	1.915/benih buatan	46.884

Setelah dihitung, biaya pembuatan *artificial seed* 25 buah sebanyak Rp.46.884,00 sehingga biaya pembuatan 1 buah Rp.1.875,00.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil percobaan yang telah dilakukan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Eksplan yang paling baik untuk pembuatan *artificial seed* kakao adalah KE, yakni eksplan belum berakar hasil perkecambahan *immature embryo* secara *in vitro*.
2. Konsentrasi alginat 2,75% (A3) merupakan konsentrasi optimal dalam pembuatan *artificial seed* hasil kultur *in vitro* kakao sampai penyimpanan 2 minggu untuk parameter jumlah akar baru dan panjang akar baru.
3. Pembuatan *artificial seed* kakao menggunakan eksplan KE dan enkapsulasi alginat 2,75% dapat disimpan sampai umur 3 minggu dengan persentase hidup 100% dan persentase berakar baru 83,33 persen.
4. Pemberian cahaya selama penyimpanan *artificial seed* memberikan pengaruh lebih baik daripada gelap sampai penyimpanan 3 minggu untuk parameter panjang akar baru, persentase berakar baru dan pertumbuhan tunas.

5.2 Saran

Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk mendapatkan bahan dan teknik enkapsulasi yang optimal untuk mewujudkan peranan *artificial seed* kakao dalam program revitalisasi pertanian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adu-Ampomah. Y.; F.J. Novak; R. Afza & M. van Duren. (1992). *Meristem tip culture of cocoa (Theobroma cacao L.)* Trop. Agric. (Trinidad), 69, 268-272.
- Adu-Ampomah. Y.; F.J. Novak; R. Afza; M. van Duren & M. Perea-Dallos. (1998). *Initiation and growth of somatic embryos of Theobroma cacao L.* Cafe, Cacao, The. 32, 187-194.
- Alemano. L, M. Berthouly and M. N. Ferriere. 1996. "*Embryogenese Somatique Du Cacaoyer a Partier De Pieces Florales*", Plantations Recherche Development.
- Alemano. L., T. Ramos, A. Gardadenec, C. Andary and N. Ferriere. 2003. "*Localization and idenfiscation of Phenolic Compounds in Theobroma cacao L. Somatic Embryogenesis* ", Annis of Botany 92 : 6,13-623.
- Anonim. 2009. *Pedoman Tarif Pelayanan dan Harga Produk LRPI*. Lembaga Riset Perkebunan Indonesia. Bogor.
- Bapat, V. A., M. Mhatre, and P. S. Rao. 1987. *Propagation of Morus Indica L. (Mulberry.) by Encapsulated Shoot Buds*. Plant Cell Rep. 6 : 393-395.
- Bapat, V. A., M. Mhatre, and P. S. Rao. 1990. *In vitro growth of Morus indica L. (Mulberry) by encapsulated shoot buds*. Plant Cell rep. 6:393- 395.
- Bapat. 1993. *Studies on synthetic seeds of sandalwood (Santalum album L.) mulberry (Morus indica L.)*. p. 381 – 407.
- Barbotin, J. N., J. E. N. Soucedo, C. Bazinet, A. Kersulec, B. Thomasset, and D. Thomas. 1993. *Immobilization of Whole Cell and Somatic Embryos Coating Process and Cell-Matrix interaction*. P. 65-103. In K. Redenbaugh (ed) "Synseeds". Application of synthetic Seeds to Crop Improvement. CRC Press Inc. Ann Arbor.
- Benson, E. E. 2000. "In Vitro Plant Recalcitrance : "An Introduction", *In Vitro and Development Biology* 36: 14 1-148.
- Boxus, P. 1998. *Plant Biotechnology Applied to Horticultural Crops*. Agricultural Research centre, Biotechnology Departement, Gembloux – Belgium. World Conference on Horticultural Research 17-20 june in Rome, Italy.

- Chand S. and Singh A. K. 2004. *Plant regeration from encapsulated nodal segments of Dalbergia Roxb.*, a timber-yielding leguminous tree species. Plant Tissue Culture and Genetiics Research Group. Devi Ahilya University. India.
- Chin, H. F. and E. H. Robert. 1980. "Recalcitrance Cropsseeds", Tropicals. SDN. BHD Kuala Lumpur. Malaysia. 152p.
- Chithra, M., Martin, K.P., Sunandakumari, C. and Madhusoodanan, V.P. 2004. *Somatic Embryogenesis, Encapsulation, and Plant Regeneration of Rotula aquatica Lour.*, a Rare Rhoephytic Woody Medicinal Plant. Springer Berlin / Heidelberg.
- Copeland, L.O. and M.B. Mc Donald. 1985. *Principles of seed Science and Technology*. Burgers Publising Company, Minneapolis Minnesota. USA.
- Esan E. B. (1975). *Tissue culture studies on cocoa (Theobroma cacao L.)*, Proceedings of 5th Int. Cocoa Reseaarch Conf. Ibadan, Nigeria, 116-125
- Fang, J. Y., A. Wetten and P. Hadley. 2004. "Cryopreservation of Cocoa (Theobroma cacao L.) Somatic Embryos For Long-Term Germplam storage". Plant Science 166 : 669-675.
- Fardiaz, D. 1989. *Hidrokoloid*. Lab. Kimia dan Biokimia Pangan Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. IPB. Bogor. Hal 360.
- Ganapathi, T.R., P. Suprasanna, V.A. Bapat and P.S. Rao. 1992. *Propagation of through encapsulated shoot tips*. Plant Cell Rep. 11 : 571 – 575.
- Ganapathi, T.R., V.A. Bapat and P.S. Rao. 1994. *In vitro development of encapsulated shoot tips of cardamom*. Biotechnol. Tech. 8 (4) : 239 – 244.
- Gardner, F.P., R.B. Pearce, dan R.L. Mitchell. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Gaspersz, V. 1994. *Metode Perancangan Percobaan Untuk Ilmu-Ilmu Pertanian, Ilmu Teknik, Ilmu Biologi*. Armico. Bandung.
- Genialab. 2008. *alginate_formel*. www.genialab.de/inventory/alginate.htm. Diakses pada 16 Oktober 2008.
- Gusmiatun. 2004. *Regenerasi Jagung (Zea mays L.) Var. Bisma Melalui Kultur Jaringan*. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Jember. Jember.
- Haris, N dan Mathius Toruan, N. 1995. *Teknologi In Vitro Untuk Pengadaan Benih Tanaman Perkebunan*. Warta Puslit Biotek Perkebunan I (1), 2 – 9.

- Jung, S. J., E. S. Yoon, J. H. Jeong and Y. E. Choi, 2004. *Enhanced Post-Germinative Growth Of Encapsulated Somatic Embryos of Siberian Ginseng By Carbohydrate Addition to The Encapsulation Matrix* “. *Plant Cell Rep.* 23 (6) : 365-70.
- Kitto, S.L and Janick, J 1985. *Production of synthetic seeds by encapsulating asexual embryos of carrot*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 110(2):277-282.
- Lee, S.K & A.N. Rao. (1982). *Induction of callus and organogenesis in cocoa tissues*. P. 107-112: In: Proceedings, International Symposium on Tissue Culture of Economically Important Plant. Singapore.
- Lestari, E.G, dan Ragapadmi, P. 2000. *Penyimpanan in vitro Tanaman Obat Daun Dewa Melalui Pertumbuhan Minimum*. Balai Besar Litbang Biotek dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Bogor.
- Li, X. Q. 1990. *Introduction to Artificial Seeds*. P 52-55. In Li, X. Q. (ed). *Studies on Artificial Seeds of Plants*. Peking University Press, Beijing.
- Mangabarani, A. 2007. *Direktori Perkebunan Indonesia 2007 – 2008*. Perisindo Communication. Jakarta.
- Maretta, D. 2008. *Kapsulasi dan Desikasi pada Pembuatan Benih Sintetik*. Blogspot.com. <http://benihsintetik.blogspot.com/2008>. Diakses pada 17 Oktober 2008.
- Mark, G J. and S. N. Maximova. 2000. “*Recent Advance in Beniwood Gardens*“. ACRI Molekular Biology. Laboratory, Tyson Building, The Pennsylvania State University Park.PA. 16802.
- Mayolo, G. A., S. N. Maximova, S. Phishak and M. J.Gultinan. 2003. “*Moxalactam as a Counter-Selection Antibiotic for Agrobacterium Mediated Tranformation and its Possitive Effects on Theobroma cacao Somatic Embryogenesis*“, *Plant Science* 164:607-615.
- Orchard, J.E.; H.A. Collin & K. Hardwick. (1979). *Culture of shoot apices of Theobroma cacao*. *Physiol. Plant.*, 47, 207-210.
- Oetami R F., 2009. *Embriogenesis Somatik Primer Pada Bagian Organ Bunga (Theobroma cacao L.)*. Tesis Program Pasca Sarjana. Universitas Jember. Jember.
- Pence, V. C, 1992. “*Abscisic Acid and the Maturation of Cacao Embryos in vitro*“. *Plant Physiol.* 98: 139 I-1395.

- Pence, V. C., P.M. Hasegawa & J. Jannick (1979). *Asexual embryogenesis in Theobroma cacao* L. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 104, 145-148.
- Piccioni, E. and A. Standardi. 1995. *Encapsulation of micropropagated buds of six wody species*. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 42 : 221-226.
- Priyono, Matsaleh dan Suhendi D. 2000. *Daya regenerasi dan Morfisme Pertumbuhan Bibit Hasil Kultur Daun Ortotrop dan Plagiotrop Coffea Canephora Melalui Embriogenesis Somatik*. Pelita Perkebunan, 16(2), 65-74.
- Ragapadmi, P., 2002. *Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik dan beberapa Gen yang Mengendalikannya*. Buletin Agrobio 5(2):51;58.
- Raharjo, P. Dan T. Wahyudi. 2006. "*Dukungan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao dalam Penyediaan Benih Kakao*". Pertemuan Teknis Perbenihan Perkebunan, Direktorat Jendral Perkebunan 27-29 Agustus 2006. Denpasar, Bali.
- Raharjo, P. 1995. "*Sertifikasi dan Penanganan Benih kakao*". Disampaikan pada Pelatihan Pengawasan mutu Benih kopi dan Kakao tanggal 9-21 Oktober 1995. Direktorat Jendral Perkebunan dan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao.
- Rao, P. V. and S. Bapat. 1991. *Plantlet Regeneration from Encapsulated Somatic Embryos of Hybrid Solanum melongena* L. Plant Cell Rep. 10 : 7-11.
- Redenbaugh, K. J. Nichol, M. Rossler, and B. Paasch. 1984. *Encapsulation of Somatic Embryos for Artificial Seed Production*. In vitro 20 : 256-257. (Abst).
- Redenbaugh, K., and S. E. Ruzin. 1988. *Artificial seed production and forestry*. p.225-238. In Dhawan, V. (ed) Applications of Biotechnology in Forestry and Horticulture. Plenum Press. New York.
- Sadjad, S. 1986. *Dari Benih Kepada Benih*. Gramedia. Widiasarana Indonesia. Jakarta.
- Salisbury, F.B. dan Ross, C.W., 1995. *Fisiologi Tumbuhan* (edisi bahasa Indonesia). ITB. Bandung.
- Sastrosupadi, A. 1999. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian*. Kanisius. Yogyakarta.
- Saiprasad, S. V. G. 2001. *Artificial Seeds and their Applications*. General Article. Division of Biotechnology, Indian Institute of Horticulture Science, Bangalore. India.

Sekretariat Direktorat Jenderal Perkebunan. 2007. *Statistik Perkebunan Indonesia 2006 – 2008 Kakao*. Jakarta.

Siahaan, F. R. 1996. “*Enkapsulasi Bibit Mikro Kentang (Solanum tuberosum L.) dengan Natrium Alginat*”. Thesis Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Sudarmonowati, E dan A. S. Bachtiar. 1994. “*Produksi Biji Buatan : Enkapsulasi Tunas Pucuk Acacia Mangium*”, hal. 25-30. Proceeding Seminar Nasional Hasil-hasil Penelitian dan pengembangan Bioteknologi II. Cibinong, Bogor.

Sukowardojo, B. 2007. *Metabolisme Perkecambahan Benih*. Fakultas Pertanian Universitas Jember. Jember.

Tahardi, J.S. (1984). *Tissue cultures of Theobroma cacao L*. Menara Perkebunan, 52, 174-178.

Tamin, M.S.M. (1991). *Regeneration of Theobroma cacao L. Plantlets from axillary bud tissues cultured in vitro*. Proc. Int. Cocoa Conf. Malaysia, 381-390.

Wang, Q and A. Perl. 2006. “*Cryopreservation Of Embryogenic Cell Suspensions by Encapsulation-Vitrification*”. Methods Mol Biol. 318 : 77-86.

Wardiyati, T. 1998. *Kultur Jaringan Tanaman Hortikultura*. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. Malang.

Wattimena, G. A. 1993. *Micropropagation as an Alternative Tecnology for Potatoes Production in Indonesia*. Ph.D. Univ. Wisconsin, Madison. 203p.

Wattimena, G.A. 1991. *Manipulasi teknik in vitro untuk penyediaan bibit kentang bermutu*. Hal 46-61.

Winarsih, S, Dan Priyono. 1995. “*Induksi Tunas Aksiler pada Kakao Secara In vitro*”. Pelita Perkebunan 11: 159-167.

Winarsih, S., D. Santoso, T. Wardiyati, 2002. “*Embriogenesis Somatic dan Regenerasi dan Eksplan Embrio Zigotic Kakao (Theobroma cacao L.)*”. Pelita Perkebunan 18(3):99-108.

Winarsih, S., D. Santoso, T. Wardiyati, 2003. “*Embriogenesis Somatic dan Regenerasi dan Tanaman pada Kultur In Vitro Organ Bunga Kakao*”. Pelita Perkebunan 19 (1): 1-16.