

Jurnal
**TANAMAN INDUSTRI
 DAN PENYEGAR**
 Journal of Industrial and Beverage Crops
 Volume 4, Nomor 3, November 2017

**PENINGKATAN INDUKSI KALUS EMBRIOGENIK DAN KONVERSI EMBRIO
 SOMATIK KOPI ROBUSTA KLON BP 308**

***IMPROVEMENT OF EMBRYOGENIC CALLI INDUCTION AND SOMATIC EMBRYO CONVERSION
 OF ROBUSTA COFFEE CLONE BP 308***

* Meynarti Sari Dewi Ibrahim¹⁾ dan Rr. Sri Hartati²⁾

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar
 Jalan Raya Pakuwon Km 2 Parungkuda, Sukabumi 43357 Indonesia
Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan²⁾
 Jalan Tentara Pelajar No. 1 Cimanggu, Bogor, 16111 Indonesia
 * meynartisaya@yahoo.com

(Tanggal diterima: 3 Agustus 2017, direvisi: 20 Agustus 2017, disetujui terbit: 26 Oktober 2017)

ABSTRAK

Kopi Robusta (*Coffea canephora*) merupakan tanaman menyerbuk silang, sehingga untuk menjamin mutu genetik benih yang dihasilkan sama dengan induknya harus diperbanyak secara vegetatif. Salah satu caranya menggunakan teknik kultur *in vitro* melalui embriogenesis somatik. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh pemberian zat pengatur tumbuh (ZPT) 2,4-D dan thidiazuron, serta penambahan bidang sayatan pada eksplan daun dalam menginduksi kalus embriogenik, dan penambahan GA₃ untuk meningkatkan konversi embrio somatik. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengadaan Benih Unggul Pertanian, Badan Libang Pertanian, Bogor, mulai bulan Desember 2014 sampai Juni 2016. Penelitian dibagi menjadi 2 tahapan. Tahap 1 menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 2 faktor, faktor pertama adalah kombinasi ZPT 2,4-D (1,0 dan 2,0 mg/l) dan thidiazuron (1,0; 3,0; dan 5,0 mg/l) dan faktor kedua adalah penyayatan daun (disayat dan tidak disayat). Tahap 2 menggunakan RAL dengan perlakuan pemberian GA₃ pada konsentrasi berbeda, yaitu 0,0; 0,5; dan 1,0 mg/l. Peubah yang diamati adalah persentase eksplan membentuk kalus, bobot segar kalus, jumlah torpedo, jumlah embrio somatik fase kotiledon, dan jumlah kecambah yang terbentuk. Hasil penelitian menunjukkan persentase pembentukan kalus embriogenik dan bobot segar kalus dipengaruhi oleh kombinasi ZPT. Penambahan bidang sayatan pada daun tidak memberikan hasil yang lebih baik dalam menginduksi kalus embriogenik. Kalus embriogenik dari media perlakuan 2,4-D 1 mg/l + thidiazuron 5,0 mg/l yang diregenerasikan menggunakan media ½ MS diperkaya kinetin 2 mg/l menghasilkan jumlah kecambah terbanyak. Penambahan GA₃ 0,1 mg/l pada media regenerasi dapat direkomendasikan untuk meningkatkan konversi embrio somatik kopi Robusta klon BP 308.

Kata kunci: *Coffea canephora*, GA₃, penyayatan, thidiazuron, 2,4-D

ABSTRACT

Robusta coffee (Coffea canephora) is a cross-pollinated plant, therefore vegetative propagation is necessary to ensure identical traits with parents, such as tissue culture techniques through somatic embryo. The study aimed to find the effect of plant growth regulator 2.4-D and thidiazuron in inducing embryogenic callus, by adding incision area on leaf explant, and to evaluate addition of GA₃ in increasing somatic embryo conversion. The study was conducted from December 2014 to June 2016 in the Tissue Culture Laboratory, IAARD, Bogor. The research consisted of 2 stages. Stage 1 used a complete randomized design of 2 factors; the first factor was a combination of plant growth regulator 2.4-D (1.0 and 2.0 mg/l) and thidiazuron (1.0; 3.0; and 5.0 mg/l), the second factor was leaf incision (slashed and unslashed). Stage 2 used a complete randomized design, with GA₃ treatment at different concentrations (0.0; 0.5; and 1.0 mg/l). Observed variables were percentage of callus formation, fresh weight of callus,

number of torpedoed, number of somatic embryos at cotyledon stage, and number of germinated embryo. The results showed growth regulatory treatments influenced the percentage of embryogenic callus formation and fresh weight of callus. Extra incision on leaf showed no effect in embryogenic callus induction. Embryogenic callus induced using 2,4-D 1.0 mg/l + thidiazuron 5.0 mg/l medium which then regenerated in 1/2 MS medium added with kinetin 2 mg/l exhibited the highest number of germination. Adding GA₃ 0.1 mg/l in regeneration medium is recommended to increase somatic embryos of Robusta coffee BP 308 clone.

Keywords: *Coffea canephora*, GA₃, slicing, thidiazuron, 2,4-D

PENDAHULUAN

Kopi Robusta (*Coffea canephora*) merupakan salah satu jenis kopi yang memiliki nilai strategis dalam rangka memberdayakan ekonomi rakyat. Sebagian besar produksi dan ekspor kopi Indonesia didominasi oleh jenis kopi ini, dengan jumlah tanaman yang dibudidayakan mencapai 90% (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2015). Tidak mengherankan jika kebutuhan terhadap benih kopi Robusta klon unggul terus berlangsung.

Kopi Robusta termasuk tanaman menyerbuk silang sehingga harus diperbanyak secara vegetatif untuk menjamin mutu genetik benih yang dihasilkan sama dengan induknya (Priyono *et al.*, 2010). Perbanyak vegetatif menggunakan teknik setek dibatasi oleh terbatasnya produksi tunas air (entres) dan jumlah ruas cabang yang dapat digunakan. Selain itu, kendala lain dalam perbanyak setek adalah akar yang dihasilkan merupakan akar serabut yang dangkal serta terkonsentrasi di sekitar permukaan tanah, sehingga tanaman kopi menjadi mudah rebah bila ditiup angin serta lebih rentan terhadap kekeringan.

Klon BP 308 merupakan salah satu varietas unggul kopi Robusta yang tahan terhadap nematoda dan toleran terhadap kekeringan (Hulupi, 2016). Meskipun mempunyai potensi produksi yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan varietas unggul lainnya, klon BP 308 dapat ditanam di daerah yang disinyalir endemik nematoda parasit, atau pada lahan-lahan di wilayah dengan curah hujan rendah. Oleh karena itu, klon BP 308 dapat dijadikan sebagai batang bawah untuk disambung pucuk dengan varietas unggul lainnya.

Salah satu alternatif untuk menghasilkan benih klonal tanaman kopi Robusta yang mempunyai akar tunggang adalah dengan memanfaatkan teknik kultur *in vitro*, menggunakan embriogenesis somatik. Regenerasi tanaman melalui jalur embriogenesis somatik memungkinkan untuk mendapatkan akar tunggang karena berkembang dari embrio yang bipolar, yaitu mempunyai dua kutub yang dapat menjadi bakal tunas dan akar.

Pada tanaman kopi, metode embriogenesis somatik telah diteliti dan memberikan alternatif perbanyak varietas unggul baru hasil persilangan maupun hasil rekayasa genetik (Gatica, Arrieta,

Espinoza, & Rica, 2009). Metode tersebut dapat digunakan untuk memproduksi benih kopi yang relatif seragam dalam skala besar dengan waktu yang lebih singkat dan bebas hama penyakit (Santos-briones & Hernández-sotomayor, 2006; Georget *et al.*, 2017).

Induksi kalus embriogenik merupakan tahapan penting dalam proses embriogenesis somatik tidak langsung. Beberapa peneliti menggunakan kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang berbeda untuk menginduksi kalus embriogenik kopi. Kombinasi ZPT 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) dengan 6-(*y,y*-dimethylallylamino) purine (2-iP) telah digunakan sebelumnya oleh Ibrahim, Hartati, Rubiyo, Purwito, & Sudarsono (2015) dan Arimarsetiowati (2011) dalam menginduksi kalus embriogenik pada kopi Arabika. Kombinasi 6-benzylaminopurine (BAP), indole-3-acetic acid (IAA), dan 2,4-D digunakan oleh Ahmed, Feyissa, & Bitima (2013) pada kopi Arabika. Kombinasi antara 2,4-D dan kinetin digunakan untuk menginduksi kalus kopi Robusta (Murni, 2010) dan kopi Arabika (Ibrahim, Sudarsono, Syafaruddin, & Rubiyo, 2012). Kombinasi 2,4-D dan BAP pada kopi Arabika (Ibrahim, Hartati, Rubiyo, Purwito, & Sudarsono, 2013b), serta kombinasi antara 2,4-D dan thidiazuron pada kopi Arabika (Ibrahim, Hartati, Rubiyo, Purwito, & Sudarsono, 2013a; Ibrahim *et al.*, 2015).

Thidiazuron merupakan senyawa fenil urea yang termasuk golongan sitokinin. Senyawa tersebut telah terbukti efektif dalam morfogenesis kalus dan tunas. Pada konsentrasi rendah dapat meningkatkan daya multiplikasi tunas, sementara pada konsentrasi tinggi akan menghasilkan kalus. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa keefektifan thidiazuron lebih baik dibandingkan dengan sitokinin lainnya (Schulze, 2007). Selain pada tanaman kopi, penggunaan thidiazuron secara tunggal maupun dikombinasikan dengan ZPT lainnya telah digunakan untuk menginduksi kalus maupun tunas pada tanaman *Populus ciliata* Wall (Aggarwal, Sharma, & Srivastava, 2012) dan *Stevia rebaudiana* (Singh & Dwivedi, 2014).

Berdasarkan hasil penelitian terdahulu, diketahui bahwa tingkat keberhasilan dalam menginduksi kalus embriogenik pada proses embriogenesis somatik tidak langsung pada kopi dipengaruhi oleh genotipe tanaman serta konsentrasi ZPT yang ditambahkan pada media induksi kalus tahap

awal (Ibrahim *et al.*, 2015). Di sisi lain, penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kalus muncul dari bekas sayatan daun (Ibrahim *et al.*, 2013a; Ibrahim *et al.*, 2015) sehingga dalam upaya meningkatkan persentase keberhasilannya perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan menambah bidang sayatan pada eksplan yang telah steril. Di samping itu, untuk meningkatkan daya perkecambahan, dilakukan penambahan GA₃ yang diketahui dapat menambah jumlah embrio berkecambah dalam medium regenerasi. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ZPT 2,4-D dan thidiazuron, serta penambahan bidang sayatan pada eksplan daun dalam menginduksi kalus embriogenik, dan penambahan GA₃ untuk meningkatkan konversi embrio somatik.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Badan Litbang Pertanian, Bogor, mulai bulan Desember 2014 sampai Juni 2016.

Persiapan Bahan Tanam

Bahan tanam yang digunakan merupakan koleksi Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar. Eksplan yang digunakan adalah daun muda kopi Robusta klon BP 308 yang telah ditumbuhkan di rumah kaca. Daun muda yang sudah membuka sempurna dipetik dan dibersihkan menggunakan air mengalir. Daun direndam dalam larutan fungisida berbahan dasar mankozeb dengan konsentrasi 0,2% ditambah dengan bakterisida (berbahan dasar streptomisin sulfat 15% dan oksitetrasiklin 1,5%) dengan konsentrasi 0,1% selama 1 jam. Setelah dibilas dengan air, daun dipindahkan ke dalam *laminar air flow*, kemudian disterilisasi menggunakan alkohol (50%), diikuti dengan *sodium hypochlorite* dengan konsentrasi 0,25% dan 0,35%, masing-masing selama 15 menit. Selanjutnya, daun dibilas aquades steril sebanyak 3 kali dan dipotong dengan ukuran ± 10 mm x 10 mm, lalu dimasukkan ke dalam media perlakuan.

Uji Pengaruh Pemberian Zat Pengatur Tumbuh dan Sayatan pada Eksplan Daun terhadap Pembentukan Kalus Embriogenik

Induksi kalus awal menggunakan media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang telah dimodifikasi kandungan amonium nitratnya menjadi setengahnya. Kemudian, ditambahkan sukrosa 30 mg/l dan *polyvinyl pyrrolidone* 250 mg/l ke dalam media dan dipadatkan menggunakan *phytagel* 2,5 g/l (Ibrahim *et al.*, 2013a). Sterilisasi media dilakukan menggunakan autoklaf

(121°C; 20 menit; 1,5 atm). Zat pengatur tumbuh ditambahkan sesuai perlakuan: (1) 2,4-D 1,0 mg/l + thidiazuron 1,0 mg/l; (2) 2,4-D 1,0 mg/l + thidiazuron 3,0 mg/l; (3) 2,4-D 1,0 mg/l + thidiazuron 5,0 mg/l; (4) 2,4-D 2,0 mg/l + thidiazuron 1,0 mg/l; (5) 2,4-D 2,0 mg/l + thidiazuron 3,0 mg/l; dan (6) 2,4-D 2,0 mg/l + thidiazuron 5,0 mg/l. Botol kultur yang telah berisi eksplan diinkubasi dalam ruang gelap pada temperatur $\pm 25^\circ\text{C}$ dan kelembapan relatif $\pm 60\%$ selama 1 bulan.

Setelah 1 bulan, eksplan daun disubkultur ke media induksi kalus lanjutan. Sebelum disubkultur sebagian eksplan dibagi 2 perlakuan, dengan dan tanpa penyayatan. Penyayatan dilakukan menggunakan pisau skapel dengan membagi dua eksplan daun menjadi 2 bagian, sehingga daun yang tadinya berukuran ± 10 mm x 10 mm menjadi ± 5 mm x 10 mm. Media induksi kalus lanjutan menggunakan MS dengan konsentrasi makro dan mikro menjadi setengah, dan mengganti vitamin MS dengan Gomborg. Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan adalah 2,4-D 1,0 mg/l dan BAP 4,0 mg/l. Media diberi sukrosa 30 gram/l dan dipadatkan dengan *phytagel* 2,5 gram/l (media MS modifikasi dari van Boxtel & Berthouly, 1996). Kalus embriogenik yang terbentuk disubkultur ke dalam media regenerasi, yaitu $\frac{1}{2}$ MS yang telah dimodifikasi dengan penambahan kinetin 2 mg/l dan *phytagel* 2,5 gram.

Perlakuan disusun menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) 2 faktor dengan 10 ulangan. Faktor pertama adalah pemberian ZPT yang terdiri dari 6 taraf kombinasi 2,4-D dan thidiazuron, sedangkan faktor kedua adalah penyayatan eksplan yang terdiri dari 2 taraf, yaitu disayat dan tidak disayat.

Pengamatan perkembangan embriogenesis somatik dilakukan dengan bantuan mikroskop AxioVision (Zeiss) dan kamera AxioCam (Zeiss). Mikroskop dihubungkan ke komputer yang mempunyai program AxioVision release 4.82. Peubah yang diamati adalah persentase eksplan membentuk kalus dan bobot segar kalus, jumlah torpedo, dan jumlah kecambah yang dihasilkan.

Uji Pengaruh Pemberian GA₃ pada Media Regenerasi

Pengujian pemberian GA₃ merupakan lanjutan dari induksi kalus. Media regenerasi yang digunakan adalah $\frac{1}{2}$ MS yang telah dimodifikasi dengan penambahan kinetin 2 mg/l dan *phytagel* 2,5 gram/l. GA₃ ditambahkan pada media sesuai dengan taraf perlakuan, yaitu 0,0 (kontrol); 0,5; dan 1,0 mg/l. Sterilisasi media dilakukan menggunakan autoklaf (121°C; 20 menit; 1,5 atm).

Kalus embriogenik sebanyak 0,25 gram disubkultur ke dalam media regenerasi. Botol kultur

kemudian diinkubasi dalam ruangan gelap pada temperatur $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dan kelembapan relatif $\pm 60\%$, sampai terbentuk embrio somatik. Embrio somatik yang terbentuk kemudian dikecambahkan pada media MS yang diberi BAP 0,3 mg/l dan phytigel 2,5 gram/l (media modifikasi dari Etienne, 2005). Botol diinkubasi pada ruang terang dengan penyinaran selama 16 jam, intensitas penyinaran 1000–1500 luks, temperatur 25°C dan kelembapan relatif $\pm 60\%$.

Perlakuan pemberian GA_3 pada media regenerasi disusun dalam RAL dengan 10 ulangan. Satu ulangan terdiri dari 1 botol yang berisi 1 klam kalus dengan berat 0,25 gram sehingga dalam satu perlakuan diperlukan 10 klam dan total kalus yang dibutuhkan adalah 100 klam (25 gram). Peubah yang diamati adalah jumlah embrio somatik fase kotiledon dan kecambah yang terbentuk.

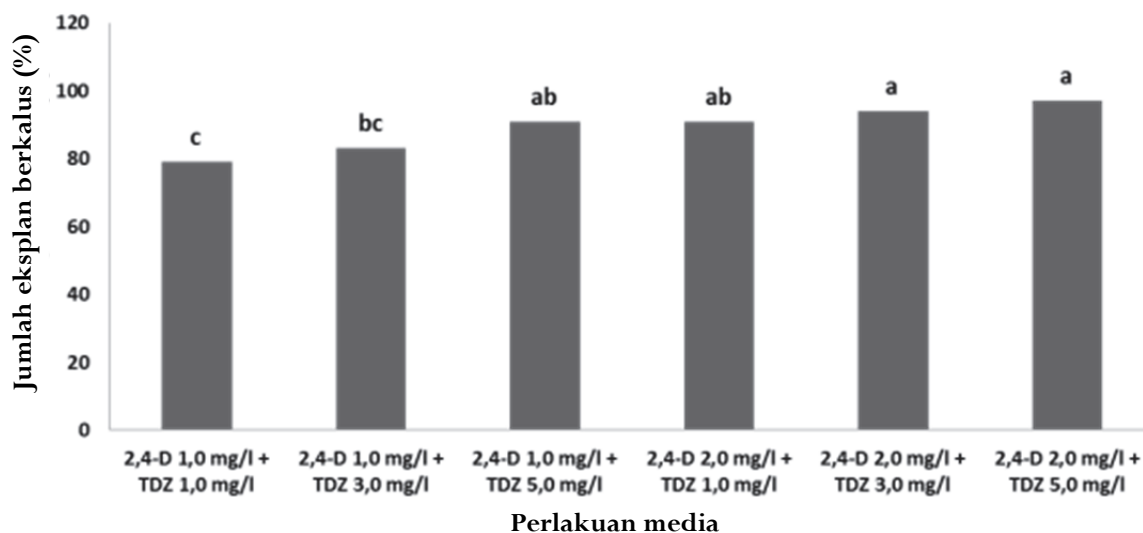
Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis ragam, dan bila hasilnya nyata maka dilanjutkan dengan uji beda rata-rata menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

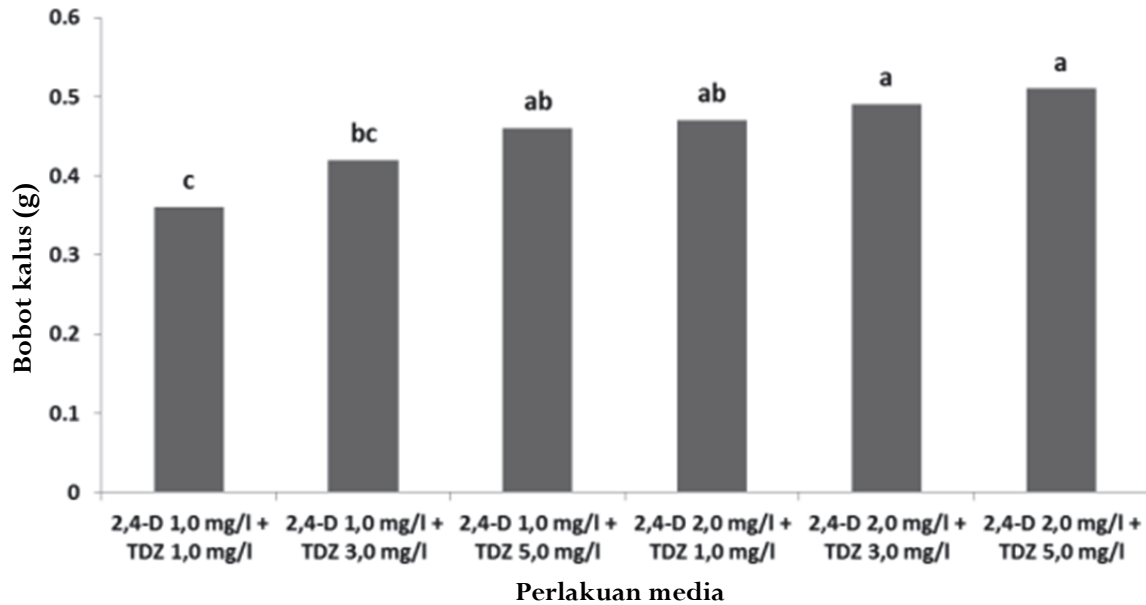
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Pemberian Zat Pengatur Tumbuh dan Sayatan pada Eksplan Daun terhadap Pembentukan Kalus Embriogenik

Hasil penelitian menunjukkan tidak ada pengaruh perlakuan penyayatan eksplan serta interaksinya dengan pemberian ZPT, tetapi perlakuan kombinasi ZPT memberikan pengaruh nyata terhadap semua parameter yang diamati. Pembentukan kalus di bekas sayatan pada perlakuan 2,4-D 2,0 mg/l + thidiazuron 3,0 mg/l dan 2,4-D 2,0 mg/l + thidiazuron 5,0 mg/l terbentuk pada minggu ketiga setelah diinduksi, sedangkan perlakuan lainnya pada minggu keempat. Munculnya kalus pada bagian sayatan diduga karena adanya rangsangan dari jaringan pada eksplan untuk menutupi bagian yang luka. Waktu yang diperlukan untuk pembentukan kalus kopi Robusta ini relatif sama dengan hasil penelitian Murni (2010) dan pada beberapa varietas kopi Arabika yang diinduksi menggunakan ZPT yang sama (Ibrahim *et al.*, 2015). Tiga bulan setelah disubkultur pada media induksi kalus lanjutan, jumlah kalus yang terbentuk semakin banyak.



Gambar 1. Pengaruh kombinasi 2,4-D dan thidiazuron terhadap persentase eksplan membentuk kalus embriogenik
Figure 1. The effect of 2,4-D and thidiazuron combination on the percentage of explant forming the embryogenic calli



Gambar 2. Pengaruh kombinasi 2,4-D dan thidiazuron terhadap rata-rata bobot segar kalus
Figure 2. The effect of 2,4-D and thidiazuron combination on average of fresh weight calli

Peningkatan konsentrasi 2,4-D dan thidiazuron dapat meningkatkan persentase pembentukan kalus embriogenik dan bobot segar kalus. Dari 6 perlakuan yang diuji, persentase tertinggi eksplan yang dapat membentuk kalus dengan bobot segar tertinggi terdapat pada perlakuan 2,4-D 2,0 mg/l + thidiazuron 3,0 mg/l, dan 2,4-D 2,0 mg/l + thidiazuron 5,0 mg/l (Gambar 1 dan 2). Hal ini menandakan bahwa semakin tinggi konsentrasi dari kombinasi 2,4-D dan thidiazuron yang diberikan, maka semakin tinggi pula persentase pembentukan eksplan berkalus dan bobot segar kalus kopi Robusta. Penambahan 2,4-D dari 1,0 mg/l menjadi 2,0 mg/l yang dikombinasikan dengan thidiazuron meningkatkan jumlah eksplan berkalus dan berat kalus (Gambar 1 dan 2).

Pembentukan kalus embriogenik dalam hal ini morfogenesis eksplan pada kultur *in vitro* sangat tergantung dari rasio auksin dan sitokinin yang diberikan pada media perlakuan. Umumnya pembentukan kalus terjadi apabila konsentrasi auksin dan sitokinin diberikan dalam konsentrasi tinggi (George, Hall, & Klerk, 2008). Penelitian menggunakan kombinasi 2,4-D dan thidiazuron ini hasilnya lebih baik 5 kali lipat dari penelitian Gatica-Arias, Arrieta-Espinoza, & Eaquivel (2008), yang menginduksi kalus kopi Arabika menggunakan thidiazuron tanpa 2,4-D. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa penambahan thidiazuron tunggal dari 2,2; 4,8; dan 6,8 μM hanya menghasilkan kalus berkisar 0 sampai 15%, bahkan pada konsentrasi 6,8 μM , kalus tidak terbentuk. Hal ini menunjukkan walaupun thidiazuron merupakan sitokinin yang

mempunyai daya aktivitas yang kuat (Schulze, 2007), jika diberikan pada konsentrasi tinggi dalam media tanpa penambahan auksin (dalam penelitian ini 2,4-D), belum mampu menghasilkan kalus.

Pembentukan kalus embriogenik merupakan tahapan penting yang harus diperhatikan dalam pembentukan embriogenesis somatik tidak langsung. Semakin banyak kalus embriogenik yang didapatkan maka semakin besar peluang untuk mendapatkan embrio somatik. Hal ini dikarenakan hanya kalus embriogenik yang dapat berkembang menjadi embrio somatik. Pada penelitian ini kalus embriogenik yang terbentuk mencapai 97%. Hasil yang diperoleh lebih baik dari penelitian yang dilakukan oleh Murni (2010) pada kopi Robusta yang menghasilkan kalus berwarna putih dan putih kehijauan, menandakan masih dijumpai adanya kalus non embriogenik. Perbedaan ini selain disebabkan oleh perbedaan ZPT, juga karena perbedaan komposisi media tumbuh yang digunakan.

Kalus kopi Robusta klon BP 308 yang terbentuk terlihat remah dan berwarna putih kekuningan. Pada Gambar 3A dan 3B dapat dilihat keragaan kalus embriogenik baik secara kasat mata maupun keragaan di bawah mikroskop. Ukuran kalus embriogenik terlihat sangat kecil, berukuran lebih kecil dari 0,1 mm. Hal yang sama juga terlihat pada penelitian Ibrahim *et al.* (2013a) dan Ibrahim *et al.* (2015) yang menggunakan beberapa varietas kopi Arabika, sehingga secara morfologi tidak terlihat perbedaan antara kalus embriogenik yang terbentuk pada kopi Arabika dan Robusta.

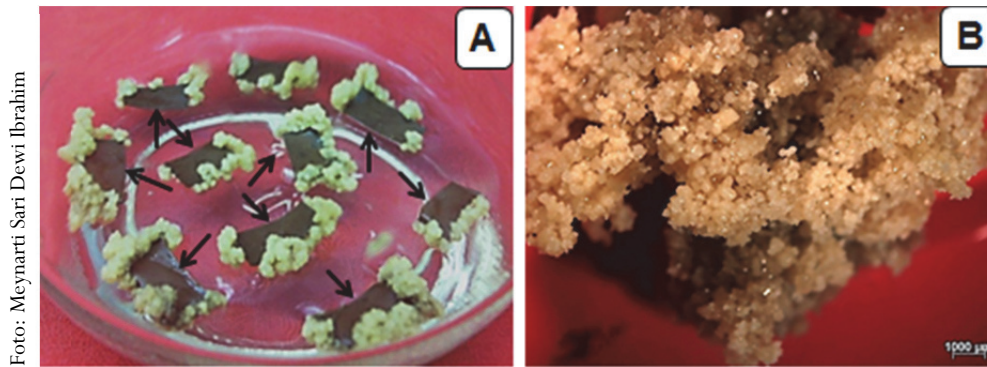


Foto: Meynarti Sari Dewi Ibrahim

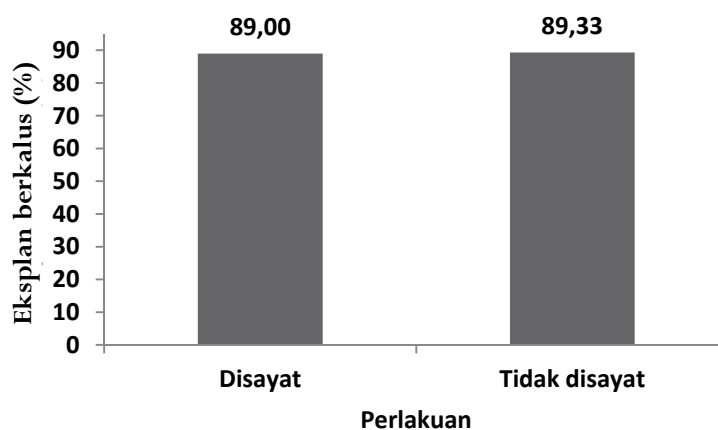
Gambar 3. Eksplan kopi Robusta klon BP 308 membentuk kalus 3 bulan setelah disubkultur ke media induksi kalus lanjutan. A = kalus tidak terbentuk pada sayatan daun yang dilakukan setelah 1 bulan di media induksi awal (tanda panah), B = kalus embriogenik di bawah mikroskop.

Figure 3. *Explant of Robusta coffee clone BP 308 generate callus 3 months after subcultured on advanced callus induction medium. A = calli does not generated on leaf sections after 1 month on initial induction medium (arrows), B = embryogenic calli performance under microscope.*

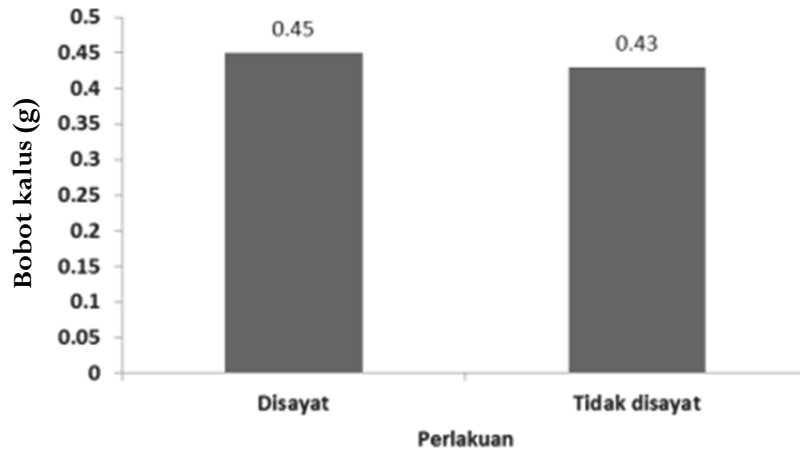
Perlakuan penyayatan eksplan tidak menunjukkan pengaruh nyata terhadap pembentukan kalus maupun bobot kalus yang dihasilkan (Gambar 4 dan 5). Penyayatan yang dilakukan satu bulan setelah kultur tidak dapat meningkatkan jumlah kalus seperti yang terlihat pada Gambar 3A. Hal ini diduga karena jaringan daun sudah tidak segar lagi. Luka yang ditimbulkan akibat proses penyayatan tidak lagi mengeluarkan senyawa metabolit sekunder yang berfungsi untuk menutupi luka. Metabolit sekunder biasanya akan bereaksi dengan ZPT yang ada pada media untuk mendorong pembelahan sel yang berlebihan sehingga terbentuk kalus. Kalus yang biasanya dihasilkan melalui kultur *in vitro* tidak terbentuk karena pelukaan yang terjadi pada jaringan daun sudah tidak merespon

ZPT pada media. Hal ini sesuai dengan pendapat George *et al.* (2008), bahwa pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi karena adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan.

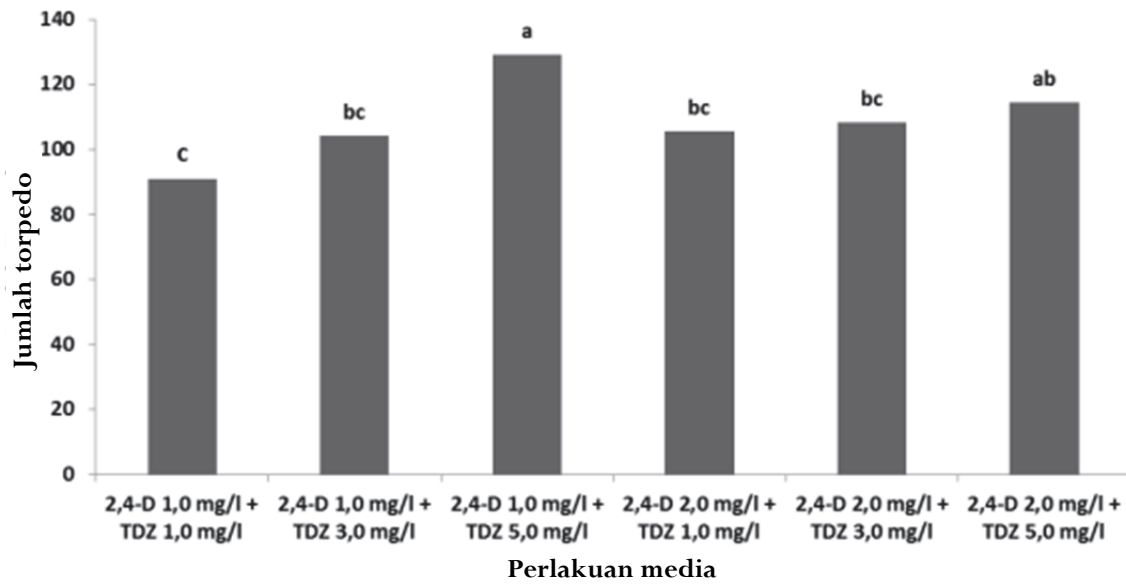
Perlakuan yang terbaik selain dilihat dari bobot segar kalus embriogenik yang dihasilkan pada tahapan induksi kalus, juga dapat dilihat dari jumlah torpedo dan kecambah yang dihasilkan. Respon terbanyak dalam menghasilkan torpedo dan kecambah pada kopi Robusta klon BP 308 adalah pada media 2,4-D 1 mg/l + thidiazuron 5 mg/l (Gambar 6 dan 7). Oleh karena itu, media ini dapat direkomendasikan untuk menginduksi kalus embriogenik.



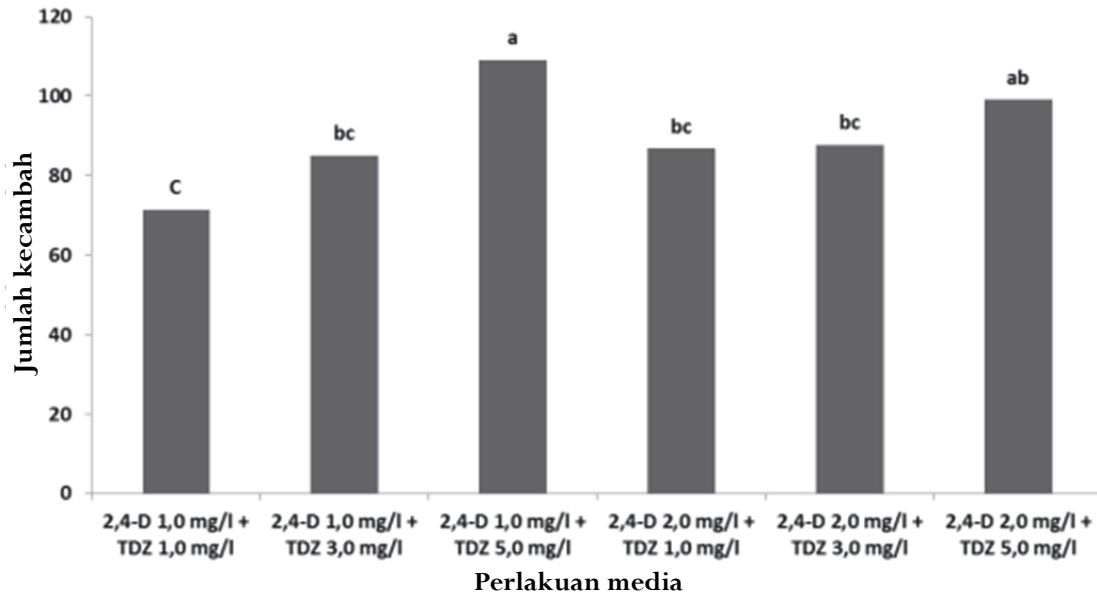
Gambar 4. Rata-rata jumlah eksplan membentuk kalus pada perlakuan penyayatan eksplan daun
Figure 4. *Average number of explants forming calli on leaf slicing treatment*



Gambar 5. Rata-rata bobot segar kalus pada perlakuan penyayatan eksplan daun
Figure 5. Average number of fresh weight calli on leaf slicing treatment



Gambar 6. Pengaruh kombinasi 2,4-D dan thidiazuron terhadap rata-rata jumlah torpedo
Figure 6. The effect of 2,4-D and thidiazuron combination on average number of torpedo

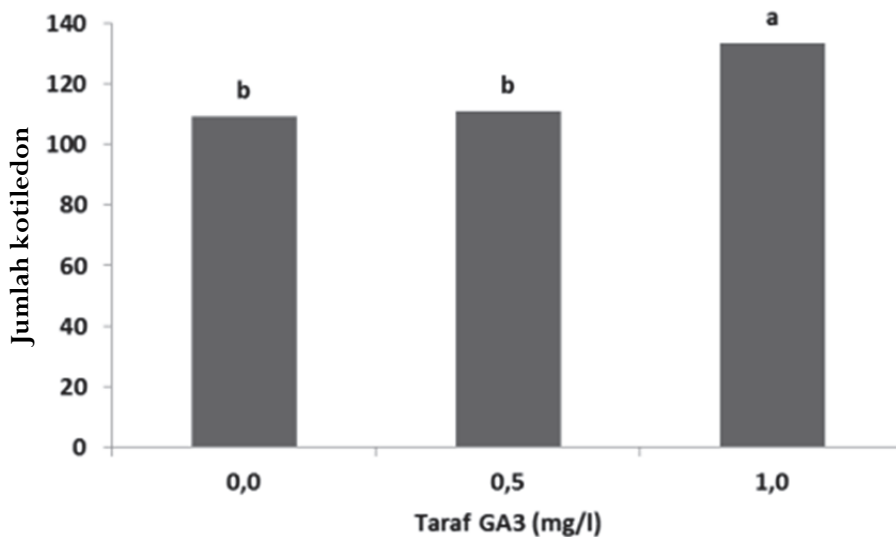


Gambar 7. Pengaruh kombinasi 2,4-D dan thidiazuron terhadap rata-rata jumlah embrio somatik yang berkecambah
Figure 7. The effect of 2.4-D and thidiazuron combination on average number of somatic embryo germinated

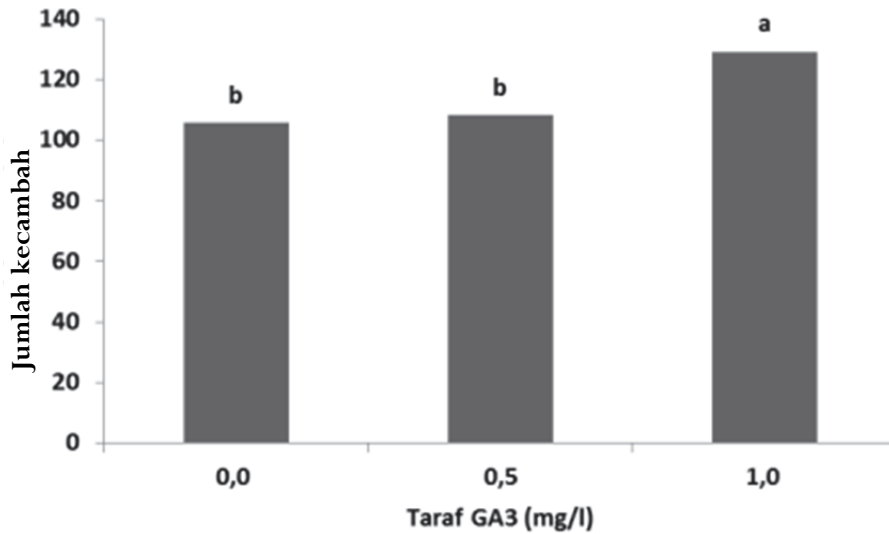
Pengaruh Pemberian GA₃ pada Media Regenerasi

Penambahan ZPT GA₃ 1,0 mg/l pada media regenerasi dapat meningkatkan jumlah kotiledon dan kecambah yang terbentuk. Gambar 8 memperlihatkan

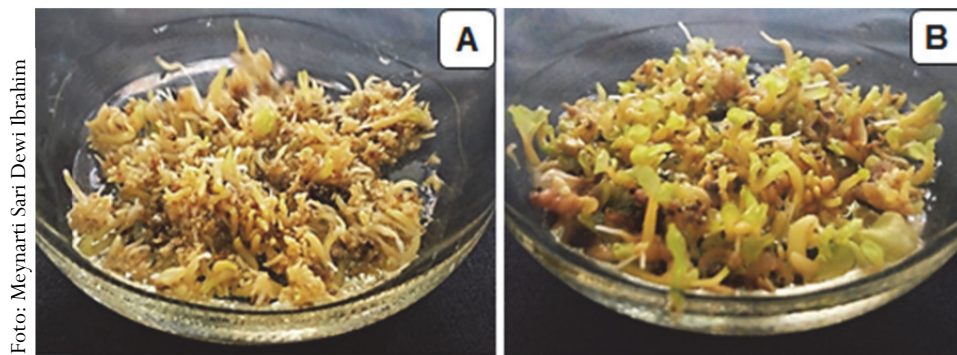
jumlah kotiledon yang dihasilkan berbeda nyata antara penambahan GA₃ 1,0 mg/l dengan GA₃ 0,0 dan 0,5 mg/l. Sejalan dengan jumlah kotiledon yang dihasilkan, jumlah kecambah yang dihasilkan juga berbeda nyata (Gambar 9).



Gambar 8. Pengaruh perlakuan GA₃ terhadap rata-rata jumlah embrio somatik fase kotiledon
Figure 8. The effect of GA₃ treatment on average number of cotyledonary somatic embryos



Gambar 9. Pengaruh perlakuan GA₃ terhadap rata-rata jumlah embrio somatik berkecambah
Figure 9. The effect of GA₃ treatment on average number of germinated somatic embryos



Gambar 10. Pembentukan embrio somatik kopi Robusta klon BP 308 menggunakan GA₃ 1,0 mg/l pada media regenerasi: A = fase kotiledon dan B = kecambah

Figure 10. Somatic embryo formation of *Coffea canephora* BP 308 clone using GA₃ 1.0 mg/l on regeneration medium: A = cotyledonary stage and B = germinated embryos

Penambahan GA₃ 1,0 mg/l pada media regenerasi ternyata dapat meningkatkan jumlah kecambah (Gambar 10). Jumlah kecambah yang dihasilkan dalam penelitian ini jauh lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian terdahulu yang juga menambahkan GA₃ pada perlakuannya. Pada embriogenesis kopi Arabika, jumlah embrio yang berkecambah per eksplan pada media MS yang diberi BAP 2,0 mg/l dan GA₃ 0,5 mg/l tertinggi hanya 14,0 ± 1,7 (Ahmed *et al.*, 2013). Sementara hasil penelitian Rezende *et al.* (2008) menunjukkan bahwa penambahan GA₃ 10,0 mg/l dan NAA 1,0 mg/l merupakan media terbaik dalam meningkatkan jumlah embrio somatik yang dihasilkan.

Proses perubahan morfogenesis embriogenesis tidak langsung kopi Robusta hampir sama dengan kopi Arabika. Pada kopi Robusta, setelah 2 bulan disubkultur

ke media regenerasi, kalus berubah warna dari kuning menjadi kuning kecoklatan. Hasil pengamatan di bawah mikroskop pada bulan ketiga dari kalus mulai muncul proembrio, yang kemudian berkembang menjadi embrio globular. Pada bulan keempat embrio somatik fase hati dan oblong mulai terlihat. Pada bulan kelima *elongated stage* mulai terbentuk dan berkembang menjadi torpedo. Embrio somatik fase kotiledon mulai terlihat pada bulan kedelapan dan satu bulan kemudian mulai berkecambah. Perkembangan embriogenesis tidak langsung kopi Robusta klon BP 308 dari fase globular sampai kecambah dapat dilihat pada Gambar 11. Morfologi embrio somatik kopi Robusta terlihat normal apabila embrio globular, oblong, hati, torpedo, dan kecambah sesuai dengan embriogenesis somatik tanaman dikotil pada umumnya.

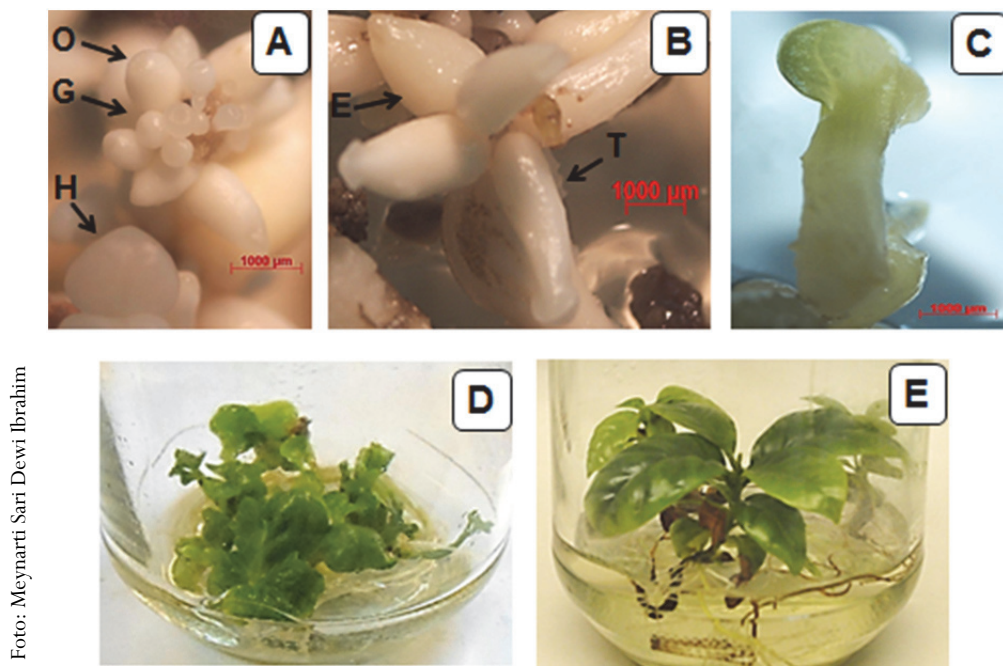


Foto: Meynarti Sari Dewi Ibrahim

Gambar 11. Perkembangan embrio somatik kopi Robusta klon BP 308: A = globular, oblong, dan hati; B = embrio memanjang dan torpedo; C = fase kotiledon; D = planlet; E = planlet siap untuk diaklimatisasi

Figure 11. Developmental stages of Robusta clone BP 308: A = globular, oblong, and heart stages; B = elongated embryo and torpedo stage; C = cotyledonary stage; D = planlet; E = planlet ready for acclimatization

Selain pada kultur *in vitro* kopi, penggunaan GA₃ juga telah dilaporkan pada tanaman lain. Pada kultur jeruk penambahan GA₃ sebanyak 1,0 mg/l dan 2,0 mg/l mampu meningkatkan perkecambahannya 60%–100% (Hidayati, 2013). Sejalan dengan penelitian tersebut, penambahan GA₃ pada jeruk keprok juga meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik. Pemberian GA₃ sebanyak 4,0 mg/l menghasilkan dua kali lipat bobot segar dibanding kontrol, sementara penambahan 8,0 mg/l meningkatkan jumlah embrio somatik sampai 70% (Firdiana, Indriyani, & Widoretno, 2015). Pada kultur teh, penggunaan thidiazuron atau BAP yang dikombinasikan dengan GA₃ pada konsentrasi di bawah 1,0 mg/l dilaporkan dapat meningkatkan jumlah tunas dan bobot segar kultur teh yang dihasilkan (Ferreira *et al.*, 2006; Gonbad, Sinniah, Aziz, & Mohamad, 2014).

KESIMPULAN

Pembentukan kalus embriogenik dari eksplan daun kopi Robusta klon BP 308 dapat diinduksi pada media ½ MS dengan penambahan kombinasi ZPT 2,4-D dan thidiazuron. Kombinasi 2,4-D dan thidiazuron dengan penyayatan daun tidak berpengaruh terhadap

pembentukan kalus embriogenik. Kalus embriogenik dari media perlakuan 2,4-D 1 mg/l dan thidiazuron 5,0 mg/l yang diregenerasikan menggunakan media ½ MS diperkaya kinetin 2 mg/l menghasilkan jumlah kecambah terbanyak. Penambahan GA₃ 0,1 mg/l pada media regenerasi dapat direkomendasikan untuk meningkatkan konversi embrio somatik kopi Robusta klon BP 308.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, G., Sharma, C., & Srivastava, D. K. (2012). Thidiazuron: A potent cytokinin for efficient plant regeneration in Himalayan poplar (*Populus ciliata* Wall.) using leaf explants. *Annals of Forest Research*, 55(2), 179–188.
- Ahmed, W., Feyissa, T., & Bitima, T. D. (2013). Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 88(4), 469–475.
- Arimarsetiowati, R. (2011). Pengaruh auksin 2,4-D dan sitokinin 2-ip terhadap pembentukan embriogenesis somatik langsung pada eksplan daun *Coffea arabica* L. *Pelita Perkebunan*, 27(2), 68–76.

- Direktorat Jenderal Perkebunan. (2015). *Statistik Perkebunan Indonesia 2014-2016 Kopi*. Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan.
- Etienne, H. (2005). Somatic embryogenesis protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In S. Mohan Jain & Pramod K. Gupta (Eds.), *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants* (pp. 167–179). Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. http://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_14
- Ferreira, P., Maria, S., Guerreiro, C., Andre, A., Geromel, C., Leroy, T., ... Vieira, E. (2006). Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3243–3258. <http://doi.org/10.1093/jxb/erl084>
- Firdiana, E. R., Indriyani, S., & Widoretno, W. (2015). The effect of gibberellin on somatic embryo growth and maturation and plantlet regeneration of tangerine (*Citrus reticulata* Blanco.) var . Batu 55. *Journal Exp.Life Sci.*, 5(1), 19–22.
- Gatica-Arias, A. M., Arrieta-Espinoza, G., & Eaquivel, A. M. E. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L . cvs . Caturra and Catuaí. *Electric Journal of Biotechnology*, 11(1), 1–12. <http://doi.org/10.2225/vol11-issue1-fulltext-9>
- Gatica, A. M., Arrieta, G., Espinoza, A. M., & Rica, C. (2009). Optimization of coffee (*Coffea arabica*) transformation parameters using uidA and hpt genes: effect of osmotic pre-treatment, helium pressure and target distance. *Revista de Biologia Tropical*, 57(Supplement 1), 151–160.
- George, E. F., Hall, M. A., & Klerk, G. J. De. (2008). The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In *Plant propagation by tissue culture 3rd edition* (Vol. 1, pp. 65–113). http://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_3
- Georget, F., Courtel, P., Garcia, E. M., Hidalgo, M., Alpizar, E., Breitler, J.-C., ... Etienne, H. (2017). Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: A boost for somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 216, 177–185. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.017>
- Gonbad, R. A., Sinniah, U. R., Aziz, M. A., & Mohamad, R. (2014). Influence of cytokinins in combination with GA 3 on shoot multiplication and elongation of tea clone Iran 100 (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *The Scientific World Journal*, 1, 1–9. <http://doi.org/10.1155/2014/943054>
- Hidayahti, N. (2013). Pengaruh osmolit, gibberelin, dan suhu dingin terhadap maturasi dan perkecambahan embrio somatik jeruk (*Citrus reticulata* Blanco.). *el-Hayah Journal of Biology*, 3(2). <http://doi.org/10.18860/elha.v3i2.2613>
- Hulupi, R. (2016). Bahan tanam kopi. In T. Wahyudi, Pujiyanto, & Misnawi (Eds.), *Kopi: Sejarah, botani, proses produksi, pengolahan produk hilir, dan sistem kemitraan* (pp. 56–102). Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. S., Rubiyono, Purwito, A., & Sudarsono. (2013a). Direct and indirect somatic embryogenesis on Arabica coffee (*Coffea arabica*). *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 14(2), 79–86.
- Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. S., Rubiyono, Purwito, A., & Sudarsono. (2013b). Induksi kalus embriogenik dan daya regenerasi kopi Arabika menggunakan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dan 6-benzyladenine. *Buletin Riset Tanaman Rempah Dan Aneka Tanaman Industri*, 4(2), 91–98.
- Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. S., Rubiyono, Purwito, A., & Sudarsono. (2015). The induction of primary and secondary somatic embryogenesis for Arabica coffee propagation. *Journal of Tropical Crop Science*, 2(3), 6–13.
- Ibrahim, M. S. D., Sudarsono, Syafaruddin, & Rubiyono. (2012). Pengaruh komposisi media terhadap pembentukan kalus embriogenesis somatik kopi Arabika (*Coffea arabica*). *Buletin Riset Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri*, 3(1), 13–22.
- Murni, P. (2010). Embriogenesis somatik pada kultur in vitro daun kopi Robusta (*Coffea canephora* var. Robusta chev.). *Biospecies*, 2(2), 22–26.
- Priyono, Florin, B., Rigoreau, M., Ducos, E.-P., Sumirat, U., Mawardi, S., ... Crouzillat, D. (2010). Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Rep*, 29, 343–357. <http://doi.org/10.1007/s00299-010-0825-9>
- Rezende, J. C. de, Ferreira, E. A., Pasqual, M., Villa, F., Botelho, C. E., & Carvalh, S. P. de. (2008). Development of *Coffea arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. *Coffee Science, Lavras*, 3(1), 30–37.
- Santos-briones, C. D. L., & Hernández-sotomayor, S. M. T. (2006). Coffee biotechnology. *Braz. J. Plant Physiol*, 18(130), 217–227.

Schulze, J. (2007). Improvements in cereal tissue culture by thidiazuron: A review. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 1(2), 64–79.

Singh, P., & Dwivedi, P. (2014). Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of *Stevia rebaudiana*, an anti-diabetic medicinal herb. *3 Biotech*, 4, 431–437. <http://doi.org/10.1007/s13205-013-0172-y>

van Boxtel, J., & Berthouly, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves: Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44(1), 7–17. <http://doi.org/10.1007/BF00045907>