Mikropropagasi Kopi Arabika *(Coffea arabica* L.) melalui Embriogenesis Somatik dan Analisis Kestabilan Genetiknya dengan RAPD

Nurita Toruan-Mathius dan Tolhas Hutabarat

Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor

ABSTRAK

Perbanyakan tanaman secara *in vitro* telah dikembangkan pada beberapa kultivar *Coffea arabica* L. menggunakan penggandaan tunas aksilar, meristem pucuk, dan eksplan melalui embriogenesis somatik dari eksplan daun. Namun, studi stabilitas genetik planlet menggunakan analisis RAPD, masih sangat terbatas. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan teknologi perbanyakan kopi arabika kate (Kartika 1) *in vitro* melalui embriogenesis somatik, dan stabilitas genetiknya dengan analisis RAPD. Potongan daun muda dikulturkan dalam medium Murashige dan Skoog yang lengkap (MS_1) dengan penambahan 0,5-2,0 mg/l 2,4-D berkombinasi dengan 1,0-5,0 mg/l kinetin, untuk menginduksi kalus embriogenik atau melalui embriogenesis tidak langsung. Sedang embriogenesis langsung diinduksi dalam medium ½ hara makro MS (MS_1) dengan penambahan 0,5-3,0 mg/l BAP berkombinasi dengan 0,1-2,0 mg/l 2,4-D. Untuk penggandaan embrio dari medium MS_1 dan $MS_{1/2}$ dilakukan dalam medium cair dengan penambahan 0,5 mg/l kinetin dan 0,05 mg/l NAA. Embrio dari medium cair dikecambahkan dalam medium padat dengan penambahan 0,5 mg/l kinetin. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa untuk inisiasi kalus embriogenik yang terbaik adalah dengan penambahan 1 mg/l 2,4-D dan 4 mg/l kinetin. Sedang untuk embriogenesis langsung adalah dengan penambahan 2 mg/l BAP berkombinasi dengan 0,5 mg/l 2,4-D. Namun, waktu yang tercepat dengan jumlah planlet dewasa terbanyak yang dapat ditransfer ke rumah kaca diperoleh dari embriogenesis tidak langsung. Analisis RAPD untuk integritas kestabilan genetik planlet dari kultur *in vitro* menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan genetik.

Kata kunci: Mikropropagasi, *Coffea arabica* L., embriogenesis somatik, kultur *in vitro*, stabilitas genetik, RAPD.

ABSTRACT

In vitro plant propagation was developed for several cultivars of *Coffea arabica* L. using axillary buds multiplication, shoot meristem, and leaf explants through somatic embryogenesis. However, study on the genetic stability of plantlets is still limited. The objective of this study was to obtain *in vitro* technique of dwarft arabica coffee (Kartika 1) propagation through somatic embryogenesis and its genetic stability with RAPD analysis. Young leaves explants were cultured in Murashige dan Skoog medium complete (MS_1) supplemented with 0.5-2.0 mg/l 2.4-D and 1.0–5.0 mg/l kinetin for embryogenic callus induction or indirect embryogenesis. While direct embryogenesis was induction in medium ½ concentration of MS macronutrient ($MS_{½}$) supplemented with 0.5-3.0 mg/l BAP combination with 0.1-2.0 mg/l 2.4-D. Embryos multiplication from MS_1 and $MS_{½}$ medium were done in liquid medium with the addition of 0.5 mg/l kinetin and 0.05 NAA. Embryos from liquid medium were germinated in solid medium supplemented with 0.5 mg/l kinetin. The results showed that the best callus embryogenic initiation was by the

addition of 1 mg/l 2.4-D and 4.0 mg/l kinetin. The best direct embryosomatic formation was found in combination of 0.5 mg/l 2.4-D and 2 mg/l BAP. However, the fastest and highest number of the mature planlet can be transffered into green house was obtained from the direct embryogenesis. RAPD assessment of the genetic integrity of plants from *in vitro* culture, revealed no significant genetic change.

Key words: Micropropagation, *Coffea arabica* L, somatic embryogenesis, *in vitro* culture, genetic stability, RAPD.

PENDAHULUAN

Masalah yang dihadapi dalam peningkatan mutu genetik dan pengembangan kopi arabika antara lain adalah pengadaan bahan tanaman unggul terpilih dalam jumlah banyak, seragam dan sifat genetis identik dengan induknya. Penyediaan bahan tanaman yang umum dilakukan adalah menggunakan benih. Kopi arabika bersifat allelotetraploid sehingga walaupun tanaman ini autogamous masalah keragaman sifat antarindividu tanaman yang diperbanyak melalui benih masih dijumpai di lapang. Hal tersebut dapat diatasi dengan menggunakan bahan tanaman klonal, namun perbanyakan dengan stek menghadapi masalah terbatasnya jumlah cabang ortotrop yang tersedia di lapang.

Perbanyakan tanaman kopi arabika dengan teknik *in vitro* sudah banyak dilakukan dan berhasil dengan baik. Penggandaan tunas aksiler berhasil dilakukan dari nodus tunas ortotrop klon USDA 230762 dengan laju penggandaan 8 tunas/6 bulan (Toruan-Mathius, 1990). Kelemahan perbanyakan kopi arabika dengan penggandaan tunas adalah laju penggandaan tunas yang masih rendah, dan ketersediaan tunas ortotrop di lapang sangat terbatas.

Untuk meningkatkan potensi perbanyakan *in vitro* beberapa peneliti lainnya berhasil memperbanyak kopi arabika melalui meristem apikal (Kartha *et al.*, 1981 dan Berthouly *et al.*, 1988), dan embrio somatik (Michaux-Ferriere dan Dublin, 1989; Neuenschwander dan Baumann, 1992; Priyono dan Danimihardja, 1992 dan Acuna, 1993). Sedang Ducos *et al.* (1993) memproduksi embrio somatik *C. arabica* cv Red Catuai menggunakan teknik bioreaktor. Menurut Ramos *et al.* (1993) secara genetis jaringan tanaman kopi arabika mempunyai kemampuan untuk memproduksi embrioid (embriogenesis) langsung dan tidak langsung. Embriogenesis secara langsung yaitu terjadinya diferensiasi jaringan eksplan membentuk embrioid tanpa melalui pembentukan kalus. Sedang embriogenesis tidak langsung yaitu diawali dengan regenerasi eksplan menjadi proembrioid yang selanjutnya berdiferensiasi membentuk embrio. Hal tersebut telah membuka kemungkinan memanfaatkan jalur embriogenesis dalam perbanyakan tanaman induk klon-klon kopi unggul hasil persilangan. Di samping itu, juga untuk menciptakan variasi somaklonal, mutagenesis, atau tanaman transgenik, dan untuk pembuatan benih sintetik.

Perbanyakan tanaman dengan teknik *in vitro* melalui pembentukan embrio somatik mempunyai beberapa keunggulan yaitu bibit dalam jumlah banyak dan se-

ragam dapat diproduksi dalam waktu relatif singkat. Khususnya pembentukan embrio somatik langsung, planlet mempunyai sifat identik dengan induknya, keragaman genetik relatif rendah, dan mempunyai akar tunggang (Evans *et al.*, 1981; Ducreux *et al.*, 1991). Salah satu masalah untuk menggunakan kultur jaringan sebagai teknik perbanyakan massal adalah adanya variasi somaklonal baru dapat dideteksi setelah tanaman dewasa. Beberapa peneliti telah menggunakan teknik *Random Amplified polymorphism DNA* (RAPD) untuk mendeteksi terjadinya variasi somaklonal pada fase planlet antara lain pada tebu (Chowdury dan Vasil, 1993; Taylor *et al.*, 1995).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode perbanyakan kopi arabika dengan teknik *in vitro* melalui embriogenesis somatik dan menetapkan kestabilan genetik planlet yang dihasilkan dengan RAPD.

BAHAN DAN METODE

Sumber eksplan yang digunakan adalah daun muda yang sudah berkembang penuh dari tanaman kopi arabika klon Kartika 1 berumur sekitar satu tahun yang dipelihara di dalam rumah kaca Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor.

Pembentukan dan Perkembangan Embrio Somatik

Sterilisasi daun muda dilakukan secara bertingkat menggunakan 0,02% sublimat, 0,2% Dithane-45, dan 0,3% Agromisin. Untuk menginduksi terbentuknya embrio somatik baik melalui alur embriogenesis langsung maupun tidak langsung, eksplan dikulturkan dalam medium Murashige dan Skoog (1962) yang dimodifikasi masing-masing dengan komposisi (a) hara penuh (MS_1) dan (b) ½ konsentrasi hara makro ($MS_{½}$). Untuk percobaan (a) ke dalam medium ditambahkan kinetin dengan konsentrasi 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 mg/l berkombinasi dengan 0,5; 1,0; 1,5 dan 2,0 mg/l 2,4-D. Sedang ke dalam medium (b) ditambahkan BAP 0,5; 1,0; 2,0 dan 3,0 mg/l masing-masing berkombinasi dengan 0,1; 0,5; dan 2,0 mg/l 2,4-D. Untuk mencegah terjadinya proses pencokelatan yang dapat menghambat pertumbuhan kalus, ke dalam medium percobaan (a) maupun (b) ditambahkan senyawa antioksidan yaitu 0,2% polivinilpirilidon (PVP). Kultur dari masing-masing percobaan diinkubasikan dalam ruangan dengan suhu 27-28°C, tanpa penyinaran atau dalam keadaan gelap selama 4-6 minggu kemudian dipindahkan ke dalam ruang bercahaya 12 jam/hari. Pengamatan dilakukan terhadap persentase eksplan yang mampu membentuk embrioid dan kalus embrioid, sedang kualitasnya diamati secara visual.

Pendewasaan dan Pengecambahan Embrio Somatik

Kalus embriogenik baik dari percobaan (a) maupun (b) di pindahkan ke dalam medium penggandaan dan pendewasaan embrio yaitu medium cair MS dengan

penambahan 0,50 mg/l kinetin dan 0,05 mg/l NAA. Medium dikocok dengan mesin pengocok berkecepatan 90 rpm, dan diinkubasikan di ruang kultur yang mendapat penyinaran selama 12 jam/hari. Setelah 14-20 minggu medium cair yang berisi embrioid kopi dituangkan ke dalam cawan Petri dan secara individu embrio dikecambahkan dalam medium MS penuh dengan penambahan 0,5 mg/l kinetin. Embrio yang belum siap untuk dikecambahkan, dikulturkan kembali ke dalam medium cair. Konsentrasi zat pengatur tumbuh untuk medium cair dan pengecambahan ditetapkan berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang sudah dilakukan.

Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang pernah dilakukan. Planlet dengan dua pasang daun yang sudah berkembang penuh, tinggi sekitar 5 cm dipindahkan ke dalam medium pot. Medium pot yang digunakan adalah pupuk kandang yang sudah dihaluskan dan dibebaskan dari nematoda dengan cara mencampur 1% Vapam untuk 0,2 m^3 pupuk yang diinkubasikan selama satu bulan.

Planlet ditanam dalam kantong plastik berisi media pot yang sudah steril, kemudian diletakkan di bawah sungkup plastik di rumah kaca selama satu bulan. Setelah dua bulan sungkup plastik dibuka, planlet dipindahkan ke dalam media baru dalam kantong plastik yang lebih besar. Penyiraman dilakukan satu kali sehari menggunakan embrat.

Analisis Kestabilan Genetik Planlet

Kestabilan genetik sebanyak 12 planlet dari 50 planlet yang dihasilkan dari sistem perbanyakan embriogenesis langsung dan tidak langsung, sedang sebagai kontrol digunakan tanaman kopi arabika Kartika 1 dianalisis dengan RAPD. Analisis DNA dilakukan menurut metode Orozco dan Castillo *et al.* (1994) yang sudah dimodifikasi khususnya penggunaan polivinilpolipirilidon (PVPP) dan merkaptoetanol sebagai antioksidan untuk mencegah terjadinya pencokelatan jaringan (*browning*).

Sebagai sumber DNA digunakan 0,5 g daun segar yang digerus menjadi tepung dalam nitrogen cair menggunakan lumpang porselein dengan penambahan 0,1 g polivinilpolipirilidon (Sigma). Bufer ekstrak (10 ml yang digunakan mengandung 10% CTAB, 100 mM Tris HCl (pH 8,0), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA). Sedang untuk pemurnian DNA menggunakan campuran 5 ml kloroform: isoamilalkohol (24:1). Contoh DNA dari hasil pemurnian dikering vakum, dan diresuspensi kembali dengan bufer TE untuk disimpan pada suhu 4°C.

Amplifikasi DNA

Reaksi PCR (50μl) mengandung 100 ng genomik DNA, dATP, dCTP,dGTP, dan dTTP masing-masing dengan konsentrasi 200μM, 400 nM primer, 1x bufer *Taq*

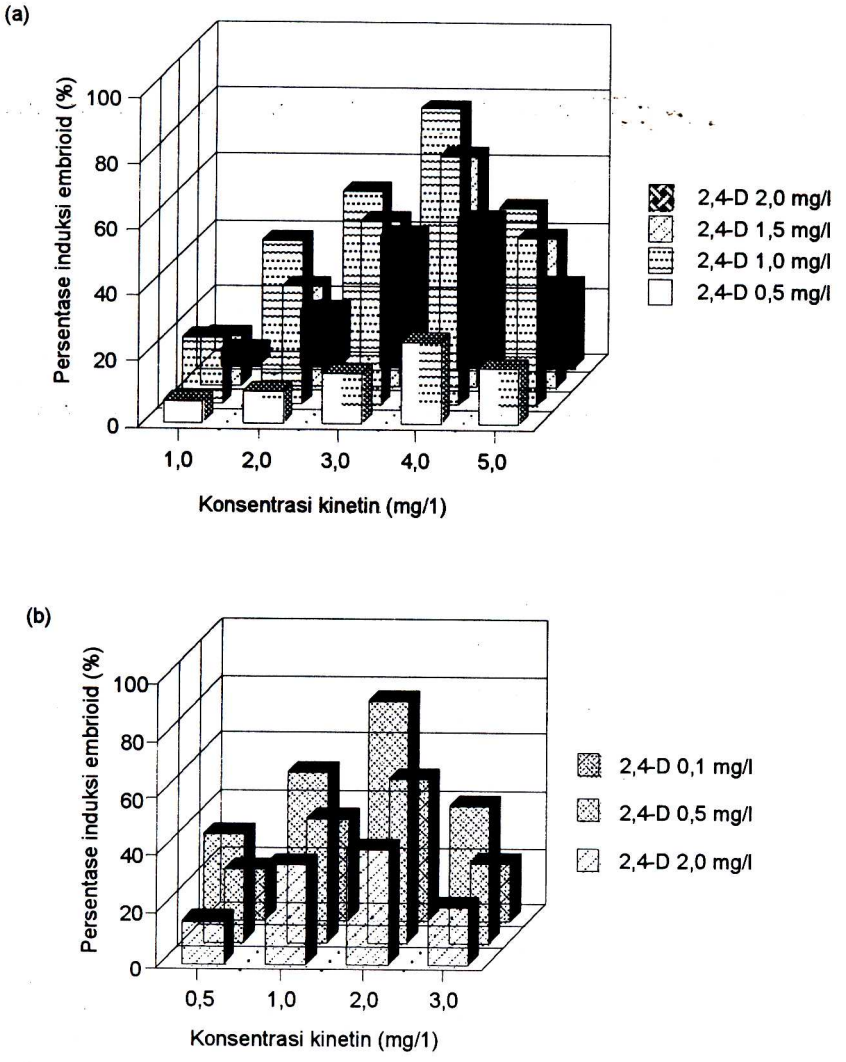
polimerase dan 1 unit *Taq* polimerase (Promega). Sebanyak 6 primer acak 10-mer yaitu abi-11716 (TACCGACACC), abi-11717 (GCTCGACACC), abi-11718 (ATCCG-TAGCC), abi-11719 (CTAGGCGTCG), abi-11720 (CGGAGAGTAC), dan abi 11721 (CCGAAGCCCT) dari Bresatec, Australia digunakan dalam penelitian ini untuk menetapkan kestabilan genetik planlet yang dihasilkan dari percobaan di atas. Reaksi PCR dilakukan menggunakan alat *Thermal cycler* dari Thermolyne, Amplitron 1. Amplifikasi dilakukan sebanyak 45 siklus dengan urutan sebagai berikut: 1 min. pada 94°C, 1 min. pada 36°C, dan 2 min. pada 72°C. Fragmen DNA hasil amplifikasi di fraksinasi pada elektroforesis yang menggunakan 8% agarose gel yang dijalankan dalam 1XTAE (0,004M Tris-Asetat dan 0,001M EDTA), dan diberi pewarnaan dengan etidium bromida dengan kecepatan 4 cm/menit. Hasil yang diperoleh selanjutnya divisualisasikan dengan cahaya ultra violet (312 nm) dan didokumentasi dengan polaroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan dan Perkembangan Embrio Somatik

Potongan daun dalam medium MS_1 (hara penuh) lebih cepat mengalami pencokelatan yaitu 2-4 minggu setelah dikulturkan, dibandingkan dengan dalam medium $MS_{1/2}$ yaitu pencokelatan eksplan terjadi setelah lebih dari empat minggu dikulturkan. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D dan kinetin perubahan warna eksplan menjadi cokelat semakin cepat yaitu sekitar 2-3 minggu setelah dikulturkan. Dalam medium MS_1 umumnya kalus tumbuh pada bagian tepi potongan eksplan daun yang sudah mengalami pencokelatan. Namun, kalus yang tumbuh dalam medium MS_1 dengan penambahan 2 mg/l kinetin dan 0,5 mg/l 2,4-D mulai terbentuk 3-4 minggu setelah dikulturkan dan menghasilkan kalus yang lembut berwarna hijau bening. Sedang warna eksplan daun tidak berubah menjadi cokelat (Gambar 2b). Tampaknya persentase eksplan yang mampu membentuk kalus embrioid dan tekstur kalus yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh ratio konsentrasi 2,4-D/kinetin yaitu dengan bertambahnya konsentrasi kinetin dan 2,4-D menghasilkan kalus yang lebih jelas membentuk struktur globoid atau *embrioid like bodies.*

Pertumbuhan kalus embrioid terjadi pada bagian eksplan yang terpotong setelah tiga bulan dikulturkan. Kecepatan pembentukan dan banyaknya kalus embrioid sangat ditentukan oleh kombinasi perlakuan 2,4-D dan kinetin. Persentase tertinggi eksplan yang mampu membentuk kalus embrioid diperoleh dari penambahan 1 mg/l 2,4-D dan 4 mg/l kinetin yaitu mencapai lebih dari 70% (Gambar 1a). Sedang struktur kalus umumnya berbutir-butir yang terdiri atas embrioid pada fase perkembangan awal yaitu proembrioid dan satu dengan lainnya sangat mudah dipisahkan (Gambar 2c). Kalus ini selanjutnya dipindahkan ke dalam medium untuk penggandaan dan pendewasaan embrio.



Gambar 1. Persentase induksi embrioid dalam medium (a) MS penuh (MS1) dengan berbagai kombinasi konsentrasi 2,4-D dan kinetin, (b) 1/2 hara makro MS (MS1/2) dengan penambahan berbagai konsentrasi 2,4-D dan BAP. Setelah enam bulan dikulturkan.

Dalam medium setengah konsentrasi hara makro tampak bahwa antara 3-4 bulan terbentuk struktur proembrio pada tepi eksplan. Dengan bertambahnya waktu, pertumbuhan proembrio terus meningkat yang terdiri atas berbagai macam tingkat

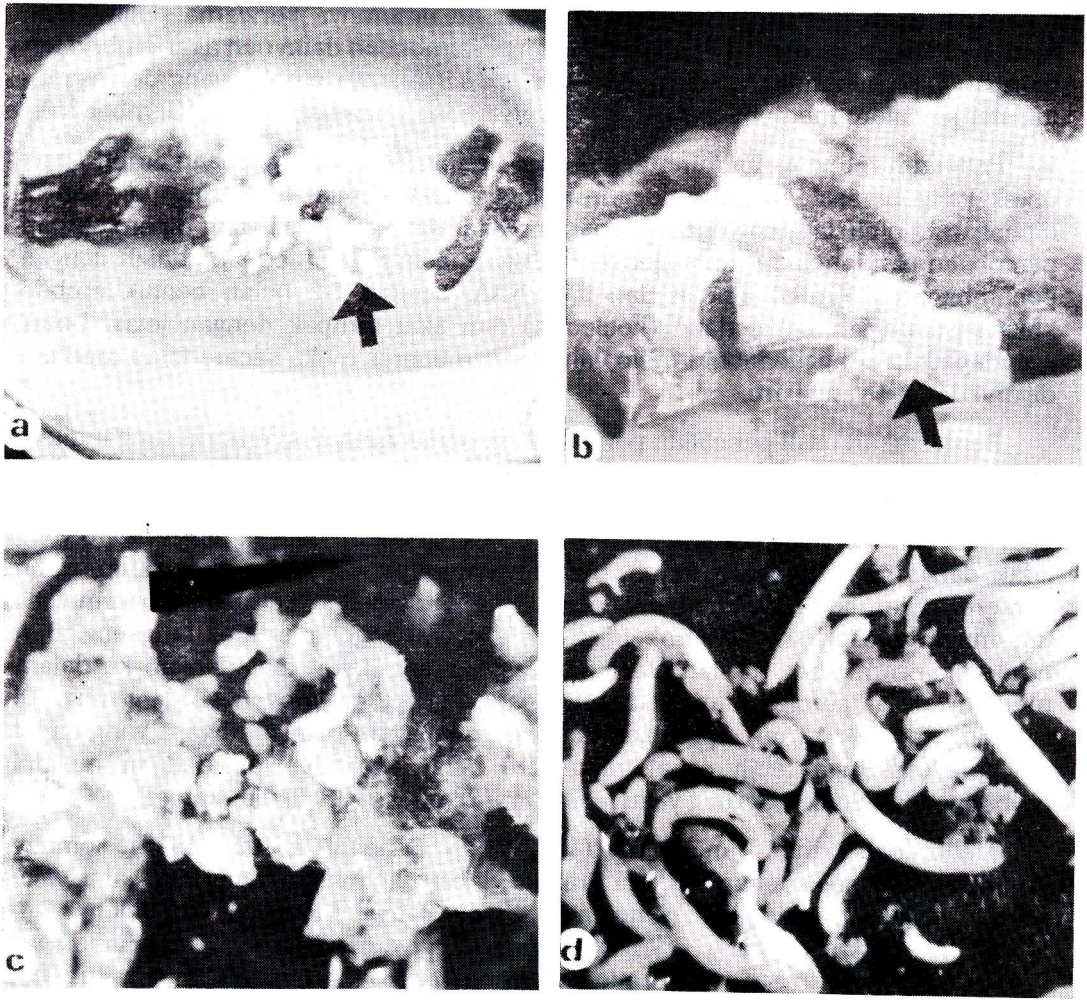
perkembangan embrio yaitu globular, hati, dan torpedo (Gambar 2a). Sebagian besar embrioid berkelompok yang terdiri atas sekitar 50-100 embrio menjadi satu, sedang lainnya terpisah. Ukuran embrio sekitar 1,5-2,0 mm, pembagian bakal akar dan daun tampak dengan jelas. Persentase eksplan yang mampu membentuk struktur embrioid dan kecepatan penggandaan embrio yang dibentuk sangat dipengaruhi oleh kombinasi 2,4-D dan BAP. Persentase eksplan yang mampu membentuk struktur embrioid terbanyak diperoleh dari perlakuan 0,5 mg/l 2,4-D mg/l dan 2 mg/l BAP yaitu mencapai lebih dari 70% (Gambar 1b). Embrio umumnya berwarna putih krem, namun di dalam medium ini perkembangan pertumbuhan daun dan akar embrio terhambat. Oleh sebab itu, untuk perkembangan selanjutnya embrio yang dewasa ditransfer ke dalam medium cair untuk pendewasaan dan penggandaan (Gambar 3a).

Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap kemampuan penggandaan embrio baik untuk yang berasal dari embriogenesis langsung maupun tidak langsung sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh yang ditambahkan. Hasil yang diperoleh dari percobaan pendahuluan menunjukkan bahwa medium yang terbaik adalah dengan penambahan 0,5 mg/l kinetin dan 0,05 NAA. Setelah 1-2 bulan bentuk embrio khususnya bagian bakal daun (kotiledon) dan akar tampak dengan jelas. Untuk mendapatkan penggandaan embrio yang terus menerus maka secara tetap medium diganti dengan yang baru.

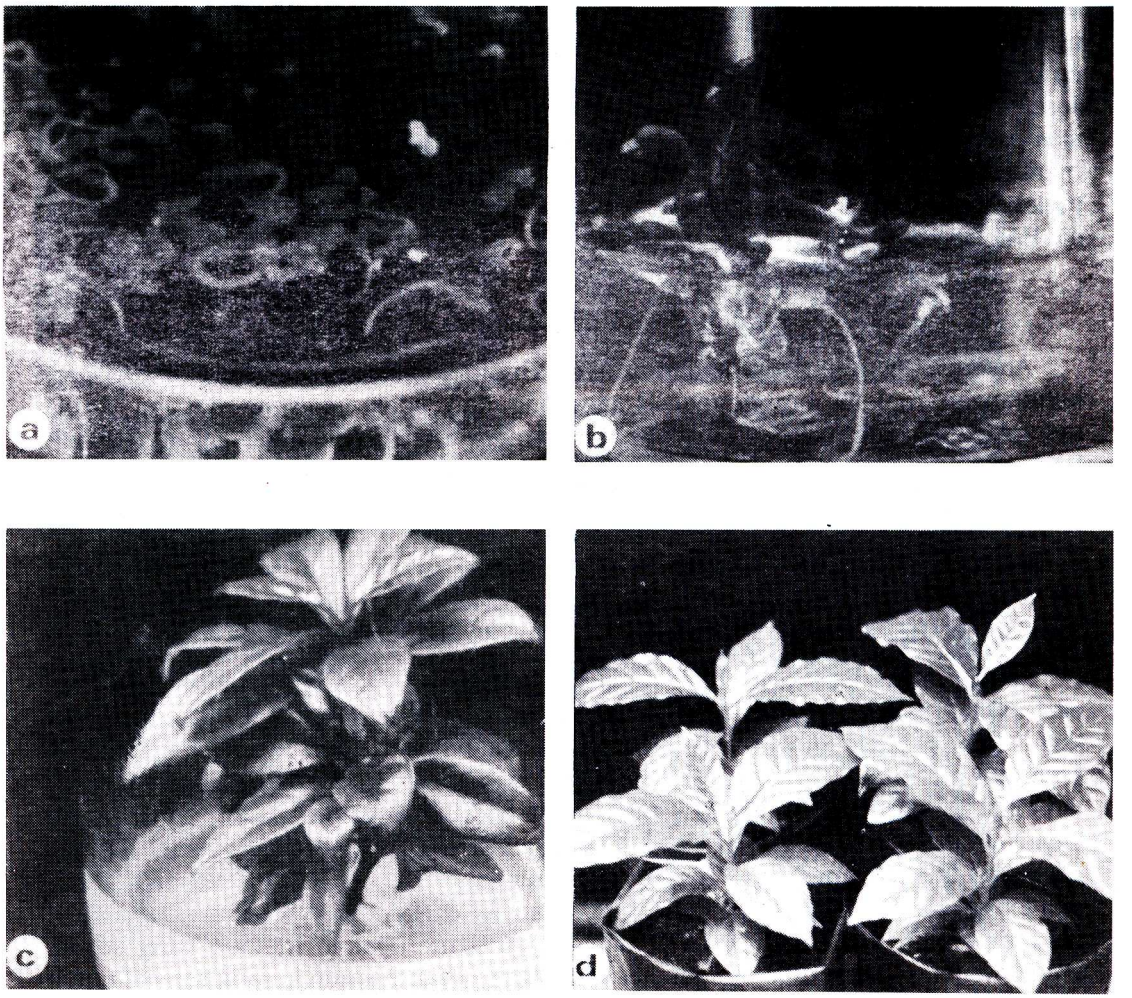
Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan perkecambahan embrio sangat ditentukan oleh konsentrasi kinetin yang ditambahkan. Kinetin yang terbaik adalah 0,05 mg/l, umumnya embrio yang dewasa dapat berkecambah dan berkembang menjadi planlet secara normal (Gambar 3b dan 3c). Namun cukup banyak juga embrio yang tidak dapat berkecambah normal, misalnya mempunyai hanya satu daun, daun berkerut, akar tidak berkembang, atau terjadi regenerasi kembali. Abnormalitas umumnya berasal dari perkembangan melalui embriogenesis tidak langsung. Dari hasil pengecambahan jumlah planlet terbanyak yang dapat dipindahkan ke dalam medium pot diperoleh dari perkembangan melalui embriogenesis langsung. Di samping itu, waktu yang diperlukan untuk mendapatkan planlet dewasa yang dapat diaklimatisasi juga lebih cepat yaitu 8-10 bulan dibandingkan dengan melalui embriogenesis tidak langsung yaitu lebih dari 12 bulan sejak dikulturkan.

Menurut Sondhal dan Sharp (1977) dan Sondahl *et al.* (1979) somatik embriogenesis pada tanaman kopi arabika dapat diinduksi melalui dua jalur yaitu secara langsung dan tidak langsung. Induksi kalus sangat ditentukan oleh adanya 2,4-D dan kinetin yang secara sinergis berfungsi untuk merangsang pembelahan sel secara terus menerus. Sedang untuk embriogenesis langsung sitokinin yaitu 2 iP, kinetin atau BAP yang lebih berperan. Bieysse *et al.* (1993) menemukan bahwa kemampuan eksplan kopi arabika untuk membentuk embrio somatik juga dipengaruhi oleh genotipik, komposisi medium, dan kondisi kultur yang digunakan. Menurut Acuna (1993) dan Ramos *et al.* (1993) respons jaringan terhadap pembentukan embriogenesis langsung dan tidak langsung juga dipengaruhi oleh

jenis tanaman kopi yang digunakan. Pada beberapa spesies kopi arabika pembentukan embrio hanya dapat terjadi melalui embriogenesis langsung. Hal ini disebabkan kalus yang dibentuk melalui jalur embriogenesis tidak langsung yaitu melalui kalus tidak mampu berdiferensiasi menjadi embrioid.



Gambar 2. (a) Embrio somatik yang berkembang melalui embriogenis langsung
(b) Kalus yang tidak dapat berkembang menjadi embrio
(c) Embrio somatik yang dibentuk secara embriogenis tidak langsung melalui pembentukan kalus embrioid
(d) Berbagai tingkat perkembangan embrio somatik, dalam medium cair.



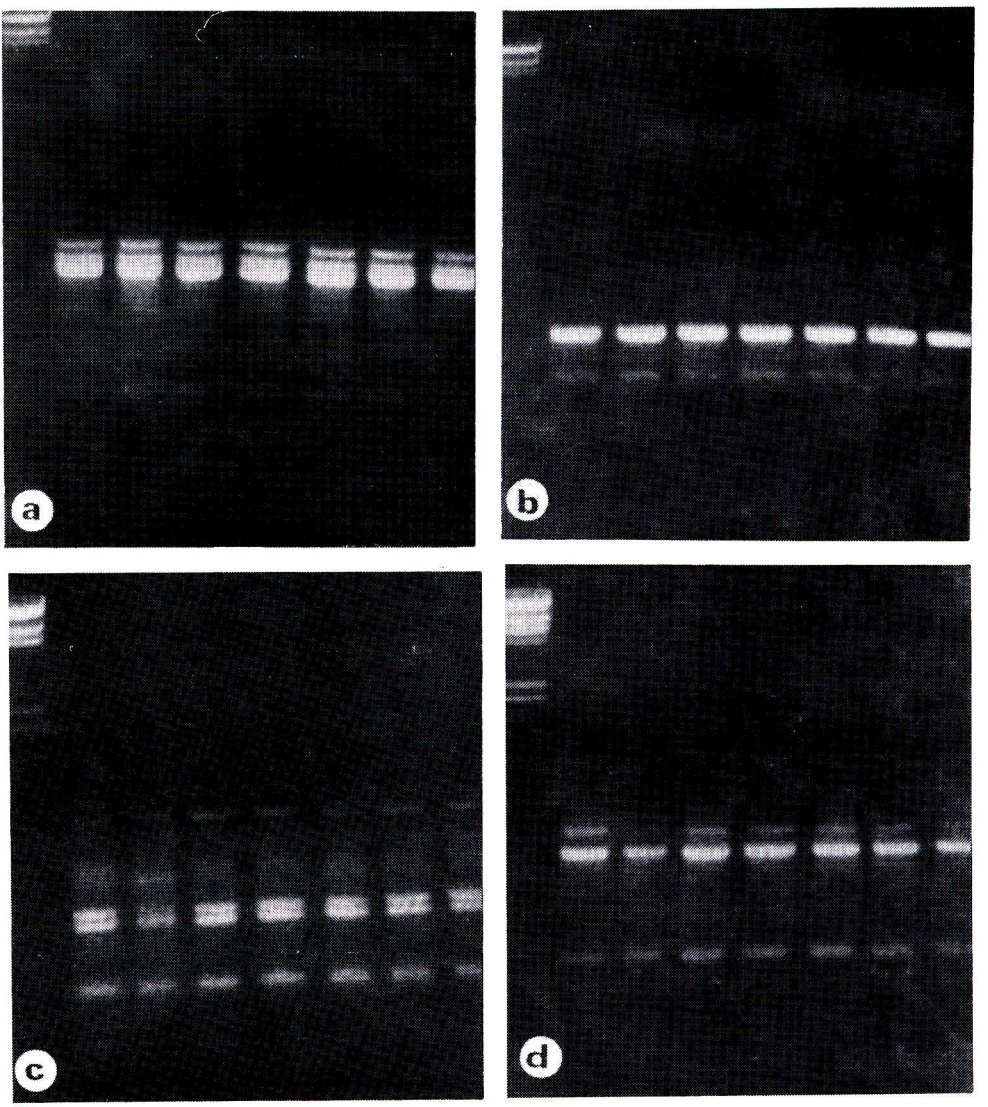
Gambar 3. (a) Penggandaan embrio somatik kopi arabika Kartika I dalam medium cair
(b) Pengecambahan embrio menjadi planlet
(c) Planlet dewasa yang siap dipindahkan ke dalam medium pot
(d) Tanaman kopi arabika Kartika I yang berasal dari kultur *in vitro*, berumur empat bulan dalam rumah kaca.

Hatanaka *et al.* (1991) menemukan pada *Coffea canephora* bahwa embriogenesis secara efektif dapat terjadi apabila di dalam medium mengandung hanya sitokinin saja. NAA menghambat embriogenesis yang secara langsung berhubungan dengan tingkat kosentrasi yang ditambahkan. Sumaryono dan Tahardi (1993) menggunakan BAP dan IBA untuk merangsang embriogenesis langsung dari eksplan daun pada kopi robusta klon B6. Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa untuk pembentukan embrioid BAP mutlak diperlukan. Priyono dan Danimiharja (1992) menyatakan bahwa air kelapa dan kasein hidrolisat dapat meningkatkan pembentukan embrio somatik secara langsung pada potongan batang muda kopi arabika. San-Jose` dan Vieitez (1993) menemukan hal yang hampir sama dengan penelitian di atas pada *Camelia japonica* dan *C. Reticulata* var. Mouchang. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa eksplan daun muda kedua tanaman tersebut berkembang melalui jalur embriogenesis langsung dalam medium MS dengan penambahan 35,5 μM BAP berkombinasi dengan 2,5 μM IBA.

Analisis Kestabilan Genetik Planlet

Analisis DNA genomik tanaman kopi hasil kultur jaringan baik untuk perkembangan melalui embriogenesis langsung dan tidak langsung dengan RAPD menggunakan enam jenis primer acak (10-mer) menghasilkan sebanyak 102 pita DNA. Masing-masing primer menghasilkan 2-6 pita hasil amplifikasi DNA. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa tidak terjadi perbedaan pita-pita DNA dari seluruh planlet yang diuji. Konsistensi pita yang dihasilkan diperoleh dari tiga kali pengulangan untuk setiap contoh tanaman dengan primer dan kondisi amplifikasi yang sama (Gambar 4). Hal ini berarti tidak terjadi perubahan genetik (variasi somaklonal) dari planlet hasil perbanyakan melalui pembentukan embrio somatik.

Chowdhurry dan Vasil (1993) juga menemukan tidak adanya perbedaan DNA dari planlet hasil regenerasi dari kultur embriogenesis *in vitro*. Hal ini disebabkan kultur yang embriogenik dan pembentukannya tidak melalui kalus penggandaan embrio umumnya terjadi dalam frekuensi yang lambat, sehingga kemungkinan terjadinya abnormalitas pada saat pengganda embrio sangat kecil kemungkinannya. Taylor *et al.* (1995) berdasarkan hasil analisis RAPD menggunakan 10-mer oligonukleotida primer juga menemukan rendahnya polimorfisme genetik antar-planlet *Saccharum* spp. hybrid yang diperbanyak melalui kalus embriogenik. Hasil yang diperoleh juga menunjukkan bahwa RAPD merupakan metode yang sesuai untuk menetapkan perubahan genetik yang agak besar. Namun kurang sensitif untuk perubahan variasi somaklonal yang disebabkan oleh perubahan genetik yang sangat kecil pada planlet tebu yang berkembang dari kalus embriogeni atau tunas apikal



Lane 1: Ukuran marka Eco R1
Lane 2 : tanaman induk
Lane 3-6 : Planlet dari hasil kultur *in vitro*

Gambar 4. Hasil aplikasi DNA genomik tanaman kopi arabika Kartika I yang berasal dari kultur *in vitro*, dengan primer abi (a) abi-111716; (b) abi-111717; (c) abi-111718; (d) abi-111719 dari ukuran marka adalah Eco R1.

KESIMPULAN

1. Perbanyakan tanaman kopi arabika Kartika 1 menggunakan eksplan daun dapat dilakukan melalui embriogenesis langsung dan tidak langsung.
2. Embriogenesis tidak langsung terbaik adalah dalam medium dengan penambahan 1 mg/l 2,4-D dan 4 mg/l kinetin.
3. Embriogenesis langsung terbaik adalah dalam medium dengan penambahan 0,5 mg/l 2,4-D dan 2 mg/l BAP.
4. Penggandaan embriosomatik dilakukan dalam medium cair dengan penambahan 0,05 NAA berkombinasi dengan 0,5 mg/l kinetin, sedang untuk medium perkecambahan dilakukan dalam medium MS padat dengan penambahan 0,5 mg/l Kinetin.
5. Analisis RAPD menunjukkan kestabilan genetik planlet kopi arabika Kartika 1 yang diperbanyak melalui somatik embriogenesis langsung maupun tidak langsung

DAFTAR PUSTAKA

Acuna, M.E.A. 1993. Somatic embryogenesis induced by culture on single media in coffee plants from crosses of *Coffea arabica* by Timor hybrid. *In* Quin zieme colloque scientifique international sur le cafe, Colloque, Monpellier 1993. Vol. I. ASIC, Paris. pp. 82-88.

Berthouly, M., N. Guzman, and P. Chatelet. 1987. Micropropagation *in vitro* de diffe`rentes ligne`es de *Coffea arabica* v. Catimor. ASIC, 12e Colloque, Montreux. pp. 462-265.

Bieysse, D., A. Gofflot, and N. Michauxferriere. 1993. Effect of experimental conditions and genotipic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. Can. J. Bot., 71(11): 1496-1502.

Chowdhury, M.K.U. and I.K. Vasil. 1993. Molecular analysis of plants regenerated from embryogenic cultures of hybrid sigarcane cultivars (*Saccharum* spp.). Theor. App. Genet. 86: 181-188

Ducos, J.P., A. Zamarripa, A.B. Eskes, and V. Petiard. 1993. Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. *In* Quinzieme colloque scientifique international sur le cafe', Montpellier, 1993. Vol. I. ASIC, Paris. pp. 89-96.

Ducreux, G., R. Haicour, and J. Vallade. 1991. Meaning of the embryogenic development: phylogenetic and cellular approach. Rev. Cytol. Bio. Veg. Bot., 24: 143-157.

Evans, D.A., W.R. Sharp, and C.E. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures. Embryogenesis and organogenesis. *In* T.A. Thorpe (*Ed.*). Plant Tissue Culture. Methods and Application in Agriculture. New York, Academic Press. pp. 45-113.

Hatanaka, T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida, and T. Yamaguci. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. Plant Cell Rep. 10: 179-182.

Kartha, K.K., L.A. Mroginski, K. Pahl, and N.L. Leung. 1981. Germplasm preservation of coffee *(Coffea arabica* L.) by *in vitro* culture of shoot apical meristems. Plant Scien. Lett., 22: 301-307.

Michaux-Ferriere, N., D. Bieysse, D. Alvard, Dublin. 1989. Histological study of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*, induced by culture on single media of leaf fragments of different genotypes. Cafe Cacao The, (Paris), XXXIII (4):207-217.

Murashige, T. dan F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioasay with tobacco tisue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

Neuenschwander, B. and T.W. Baumann. 1992. A novel type os somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. Plant Cell Rep. 10: 608-612.

Orozco-Catillo, C., K.J. Chalmers, R. Waugh, and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87: 934-940.

Priyono and S. Danimihardja. 1992. Kultur embrio somatik kopi arabika menggunakan air kelapa, casein hidrolisat, glutamin dan asparagin. Zuriat, 3(1): 43-55.

Ramos, L.C.S., E.Y. Yokoo, and W. Goncalves. 1993. Direct somatic embryogenesis is genotype specific in coffe. *In* Qienzieme colloque scientifique international sur le cafe. p. 763-766. Montpellier, 1993. Vol. II. ASIC, Paris.

San-Jose, M.C. and A.M. Vieitez. 1993. Regeneration of Camellia planlets from leaf explant cultures by embryogenesis and caulogenesis. Scient. Hort. 54: 303-315.

Sondahl, M.R. and W.R. Sharp. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphys. 81: 395-408.

Sondahl, M.R., D.A. Spahlenger, and W.R. Sharp. 1979. A histology study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphys. 94: 107-108.

Sumaryono dan S. Tahardi. 1993. Perbanyakan klon kopi robusta toleran nematoda. Menara Perkebunan 61(3): 50-55.

Taylor, P.W.J., T.A. Fraser, H.L. Ko, and R.J. Henry. 1995. RAPD analysis of sugarcane during tissue culture. *In* M. Terzi , R. Cella and A. Falavigna (*Eds.*). Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Kluwer Acad. Pub., Netherlands. pp. 241-246.

Toruan-Mathius, N. 1990. Perbanyakan tanaman kopi arabika *(Coffea arabica* L.*)* dengan teknik kultur jaringan. Pros. Simposium Kopi 1990, Jilid II. Surabaya 20-21 November 1990. Asosiasi Penelitian dan Pengembangan Perkebunan Indonesia dan Pusat Penelitian Perkebunan Jember. pp. 22-36