

Jurnal
**TANAMAN INDUSTRI
DAN PENYEGAR**
Journal of Industrial and Beverage Crops
Volume 6, Nomor 1, Maret 2019

**RADIOSENSITIVITAS KALUS EMBRIOGENIK KOPI ROBUSTA BP 436
TERHADAP IRADIASI SINAR GAMMA**

***RADIOSENSITIVITY OF EMBRYOGENIC CALLUS OF ROBUSTA COFFEE BP 436 AGAINST
IRRADIATION OF GAMMA RAYS***

* Meynarti Sari Dewi Ibrahim¹⁾, Enny Randriani¹⁾, Laela Sari²⁾, dan Anne Nuraini³⁾

Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar¹⁾

Jalan Raya Pakuwon Km 2, Parungkuda, Sukabumi, 43357, Jawa Barat, Indonesia

* meynartisaya@yahoo.com

Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI²⁾

Jalan Raya Bogor Km 46, Cibinong, 16911, Jawa Barat, Indonesia

Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran³⁾

Jalan Raya Bandung Sumedang Km.21, Hegarmanah, Jatinangor, 45363, Sumedang, Jawa Barat, Indonesia

(Tanggal diterima: 7 Februari 2019, direvisi: 22 Februari 2019, disetujui terbit: 30 Maret 2019)

ABSTRAK

Keragaman genetik tinggi merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan pemuliaan tanaman, termasuk pada tanaman kopi. Induksi mutasi dengan iradiasi sinar gamma merupakan salah satu cara untuk meningkatkan keragaman genetik tanaman. Tujuan penelitian adalah: 1) memperoleh komposisi zat pengatur tumbuh yang sesuai untuk menginduksi kalus embriogenik, 2) mengetahui pengaruh iradiasi sinar gamma terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik, 3) mendapatkan nilai lethal dose (LD)₂₀ dan ₅₀ pada kopi Robusta klon BP 436. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar, mulai bulan Mei 2017 sampai Desember 2018. Eksplan yang digunakan adalah daun muda kopi Robusta klon BP 436. Induksi kalus menggunakan media ½ MS dengan perlakuan pemberian 2,4-D (4,52 µM) dan 2-iP (0,00; 4,93; 9,86; 14,79; dan 19,72 µM). Induksi mutasi menggunakan sinar gamma dengan perlakuan 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 Gy. Media ½ MS ditambah GA₃ (0 dan 1 mg/l) digunakan pada media regenerasi. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 10 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan kombinasi zat pengatur tumbuh terbaik untuk menginduksi kalus kopi Robusta BP 436 adalah 2,4-D 4,52 µM + 2-iP 19,72 µM. Iradiasi sinar gamma di atas 30 Gy dapat menghambat penambahan bobot basah kultur, sementara jumlah embrio somatik menurun pada dosis di atas 10 Gy. Penambahan GA₃ 1 mg/l pada media regenerasi dapat meningkatkan jumlah embrio somatik fase torpedo, namun tidak pada kalus yang dimutasi sinar gamma. Nilai radiosensitivitas LD₂₀ dan LD₅₀ kopi Robusta BP 436 adalah 16,81 dan 28,52 Gy.

Kata kunci: *Coffea canephora*, dosis letal (LD₂₀ dan ₅₀), embrio somatik, induksi kalus, mutasi

ABSTRACT

High genetic diversity is one factor that determines the success of plant breeding. Mutation induction by gamma ray irradiation is one method to improve plant genetic diversity. This study aimed to 1) obtain growth regulators composition suitable in inducing embryogenic callus, 2) determine the effect of gamma ray irradiation on the growth and development of somatic embryos, and 3) obtain lethal dose (LD)₂₀ and ₅₀ values in Robusta coffee BP 436. The study was conducted at the Tissue Culture Laboratory, Industrial and Beverage Crops Research Institute, from May 2017 to Desember 2018. Explants used were young leaves of Robusta coffee BP 436. Callus induction used ½ MS media with 2,4-D (4.52 µM) and 2-iP (0.00; 4.93; 9.86; 14.79; and 19.72 µM) treatment. Mutation induction was performed using gamma radiation dosed at 0, 10, 20, 30, 40, and 50 Gy treatments. The regeneration media was ½ MS containing GA₃ (0 and 1 mg/l). The study used a complete randomized design with 10 replications. The results showed the best combination of plant growth regulator to induce the callus was 2,4-D 4.52 µM + 2-iP 19.72 µM. The fresh weight of cultures was inhibited above 30 Gy, whereas the number of somatic embryos decreased at doses above 10 Gy. Addition of GA₃ 1 mg/l in regeneration media increased the number of somatic embryos in torpedo phase, but not in gamma irradiation exposed calluses. The LD₂₀ and LD₅₀ of Robusta coffee BP 436 are 16.81 and 28.52 Gy, respectively.

Keywords: *Coffea canephora*, callus induction, lethal dose (LD₂₀ dan LD₅₀), mutation, somatic embryo

PENDAHULUAN

Kopi Robusta (*Coffea canephora*) merupakan jenis kopi yang paling banyak ditanam di Indonesia, hal ini ditunjukkan dengan nilai ekspor kopi 80%–90% didominasi oleh kopi Robusta (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2017). Indonesia merupakan pengekspor kopi Robusta terbesar ketiga di dunia setelah Brazil dan Vietnam (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2017). Kelebihan kopi Robusta asal Indonesia memiliki cita rasa yang tidak dimiliki oleh negara lain, sehingga menjadi kebanggaan tersendiri untuk Indonesia (Puslitkoka, 2016).

Kopi Robusta sebagian besar (>70%) diusahakan oleh rakyat. Oleh karena itu pengembangan kopi Robusta merupakan salah satu alternatif untuk meningkatkan pendapatan petani dan penerimaan devisa negara (Puslitkoka, 2016). Namun keberadaan dan pengembangan tanaman kopi terutama kopi Robusta saat ini masih terkendala produktivitas dan ketahanan terhadap hama dan penyakit. Untuk mengatasi permasalahan tersebut diperlukan adanya varietas unggul baru kopi Robusta. Kopi Robusta BP 436 merupakan salah satu varietas yang mempunyai produktivitas tinggi ($\pm 2,1$ ton/ha/tahun), namun rentan terhadap penggerek buah kopi dan nematoda (Puslitkoka, 2016). Untuk memperbaiki ketahanan terhadap hama dan penyakit, maka keragaman genetik dari kopi Robusta BP 436 perlu ditingkatkan. Perakitan varietas baru tanaman tahunan seperti kopi secara konvensional membutuhkan waktu yang lama. Untuk mempercepat proses perakitan diperlukan metode non konvensional, salah satunya dengan memanfaatkan induksi mutasi dan seleksi *in vitro*. Pemanfaatan mutasi telah terbukti dapat meningkatkan terjadinya keragaman genetik pada beberapa tanaman tahunan (Jain, 2010; Penna & Jain, 2017).

Penggunaan teknik induksi mutasi sangat baik digunakan untuk tanaman yang tidak tersedia sumber tetua (*land race*) (Sari, Purwito, Sopandie, Purnamaningsih, & Sudarmanowati, 2015), seperti ketahanan terhadap penggerek buah kopi. Sedangkan ketahanan terhadap nematoda sudah diperoleh klon yang tahan (BP 308), tetapi terkendala oleh lamanya proses persilangan. Dengan demikian, penggunaan teknik pemuliaan mutasi diharapkan dapat mempersingkat waktu untuk mempercepat ditemukannya varietas unggul baru.

Mutasi terjadi akibat perubahan secara tiba-tiba dan acak pada materi genetik (genom, kromosom, gen) (Penna & Jain, 2017). Pada tanaman kultur *in vitro*, mutasi dapat diinduksi secara fisik menggunakan iradiasi, maupun secara kimia dengan menggunakan senyawa yang bersifat mutagen. Mutagen fisik menggunakan radiasi ion seperti sinar x, sinar gamma, neutron, partikel beta, partikel alfa, dan proton. Sinar gamma sangat luas digunakan pada kegiatan pemuliaan tanaman (U.S. Environmental Protection Agency, 2010; Asadi, 2013; Lestari, 2012). Tanaman yang pernah diinduksi keragaman genetiknya menggunakan iradiasi sinar gamma adalah anyelir (Aisyah, Aswidinnoor, Saefuddin, Marwoto, & Sastrosumarjo, 2009), krisan (Yamaguchi, Shimizu, Degi, & Morishita, 2008), kumis kucing (Kiong, Lai, Hussein, & Harun, 2008), tebu (Suhesti *et al.*, 2015), padi (Bibi *et al.*, 2009; Yunita, Khumaida, Sopandie, & Mariska, 2014), gandum (Singh & Balyan, 2009), rimpang jahe (Bermawie, Meilawati, Purwiyanti, & Melati, 2015), dan kacang-kacangan (Tah & Saxena, 2009).

Keberhasilan pemuliaan mutasi menggunakan sinar gamma tergantung pada tingkat iradiasi dan genotipe tanaman (Roslim, Herman, & Fiatin, 2015). Tingkat mutasi tergantung pada fase pertumbuhan tanaman, ukuran, dan ketebalan material (Yalindua, Sudarsono, Setiawan, & Bintoro, 2014). Sementara itu,

tingkat sensitivitas tanaman terhadap iradiasi sinar gamma dipengaruhi oleh jenis tanaman, fase tumbuh, ukuran dan kondisi fisiologis eksplan, bahan yang dimutasi, serta sangat bervariasi antar jenis tanaman dan antar genotipe (Yunita, Khumaida, Sopandie, & Mariska, 2014). Pemakaian teknik mutasi pada kalus embriogenik dan diregenerasikan melalui embriogenesis somatik merupakan cara yang paling besar peluangnya untuk mendapatkan banyak varian. Mutasi yang dihasilkan bersifat solid (tidak khimera) karena proses mutasi dapat dilakukan pada tingkat sel (Mba, 2013). Selain itu, tanaman yang dihasilkan melalui embriogenesis somatik mempunyai akar tunggang sehingga lebih toleran terhadap cekaman kekeringan dibandingkan dengan organogenesis yang menghasilkan akar serabut.

Salah satu cara untuk mengetahui tingkat radiosensitivitas tanaman terhadap pengaruh iradiasi sinar gamma adalah dengan mengetahui nilai *lethal dosis* (LD) atau *lethal concentration* (LC) untuk mutagen kimia. Dosis optimum untuk menghasilkan mutan terbanyak umumnya berada di sekitar dosis lethal 50 (LD₅₀) (Datta, 2000). Penggunaan dosis LD₅₀ dilaporkan dapat menghasilkan varietas baru tanpa merusak sifat agronomis yang baik. Sementara, variabilitas mutan tertinggi terdapat pada mutan hasil iradiasi sinar gamma dengan nilai antara LD₂₀ dan LD₅₀ (Soeranto, 2012). Oleh karena itu, dalam perlakuan mutasi nilai LD₂₀ dan LD₅₀ biasanya ditentukan terlebih dahulu.

Penelitian mengenai nilai LD₂₀ dan LD₅₀ pada kalus kopi belum pernah dilaporkan, demikian juga dengan pengaruh penggunaan iradiasi sinar gamma pada pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik kopi. Penelitian bertujuan: 1) memperoleh komposisi zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sesuai untuk menginduksi kalus embriogenik, 2) mengetahui pengaruh iradiasi sinar gamma terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik, dan 3) mendapatkan nilai LD₂₀ dan LD₅₀ pada kopi Robusta klon BP 436.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar (Balittri), Parungkuda, Sukabumi, mulai bulan Mei 2017 sampai Desember 2018. Iradiasi sinar gamma dilakukan di Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi (PATIR), Badan Tenaga Nuklir Nasional (Batan), Jakarta. Penelitian terdiri dari dua rangkaian kegiatan, yaitu: 1) induksi kalus kopi Robusta BP 436, 2) induksi mutasi dan regenerasi embrio somatik hasil mutasi iradiasi sinar gamma.

Induksi Kalus Kopi Robusta BP 436

Daun muda kopi Robusta BP 436 diambil dari koleksi plasma nutfah Balittri yang terdapat di Kebun Percobaan (KP) Pakuwon. Daun yang telah membuka sempurna dipetik, dibungkus plastik bening, kemudian dibawa ke laboratorium. Daun dibersihkan menggunakan air mengalir lalu direndam dengan fungisida (berbahan dasar mankozeb 0,2%) dan bakterisida (berbahan dasar streptomisin sulfat 15% dan oksitetrasiklin 1,5%) dengan konsentrasi 0,1% selama 1 jam. Setelah dibilas dengan air, daun disterilisasi menggunakan alkohol (50%), diikuti dengan *sodium hypochlorite* dengan konsentrasi 0,25% dan 0,35%, masing-masing selama 15 menit. Selanjutnya, daun dibilas menggunakan aquades steril sebanyak 3 kali. Proses tersebut dilakukan di dalam *laminar air flow*.

Daun tanpa *midrib* dipotong dengan ukuran 10 mm x 10 mm. Lima potongan daun dikulturkan ke dalam satu botol kultur menggunakan media *Murashige and Skoog* (MS) 1962 dengan konsentrasi hara makro dan mikro setengahnya. Media ditambahkan sukrosa 30 g/l, *polyvinylpyrrolidone* (PVPP) 250 mg/l, dan *phytagel* 2,5 g/l. Perlakuan yang diuji adalah kombinasi ZPT auksin (2,4-D) dengan konsentrasi 4,52 µM dan sitokinin (2-iP) dengan konsentrasi 0 (tanpa 2-iP); 4,93; 9,86; 14,79; dan 19,72 µM. Media disterilkan menggunakan autoklaf (121°C; 20 menit; 1,5 atm). Botol yang telah berisi potongan daun diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 23±1°C.

Eksplan yang mulai membentuk kalus (satu bulan setelah berada di media induksi kalus awal), selanjutnya disubkultur ke media induksi kalus lanjutan. Media yang digunakan adalah konsentrasi ½ MS, ditambah dengan *casein hydrolysate* 200 mg/l; *malt extract* 800 mg/l; 2,4-D 4,52 µM; BAP 17,76 µM; sukrosa 30 g/l; dan *phytagel* 2,5 g/l. Kultur diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 23±1°C.

Kegiatan penelitian dirancang secara acak lengkap dengan 10 ulangan. Peubah yang diamati adalah persentase eksplan yang membentuk kalus, bobot basah kalus, pertambahan bobot basah kultur, dan visualisasi kalus (warna dan kekompakan kalus) yang dihasilkan.

Induksi Mutasi dan Regenerasi Embrio Somatik Hasil Mutasi Iradiasi Sinar Gamma

Induksi mutasi menggunakan sinar gamma dilakukan pada kalus embriogenik kopi Robusta BP 436. Peralatan iradiasi menggunakan *gamma chamber* dengan sumber radiasi berasal dari *cobalt 60*. Botol kultur berisi 3 klam kalus embriogenik diiradiasi sinar gamma pada dosis 0 (kontrol), 10, 20, 30, 40, dan 50 Gy. Kalus hasil iradiasi dan tanpa iradiasi kemudian disubkultur ke media regenerasi. Media regenerasi menggunakan

media MS dengan konsentrasi $\frac{1}{2}$ dari normal (Ibrahim *et al.*, 2015). Perlakuan media yang diuji adalah penambahan ZPT kinetin 2 mg/l tanpa GA₃ dan menggunakan GA₃ 1 mg/l. Sebelum disubkultur, kumpulan kalus embriogenik ditimbang dengan berat $\pm 0,2$ gr. Kultur kemudian diinkubasi dalam ruang kultur gelap bersuhu $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Embrio somatik fase torpedo yang terbentuk disubkultur ke media perkecambahan menggunakan media MS yang diberi BAP 0,3 mg/l.

Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap 2 faktor. Faktor pertama konsentrasi sinar gamma (0, 10, 20, 30, 40, dan 50 Gy) dan faktor kedua adalah taraf GA₃ (0 dan 1 mg/l). Perlakuan diulang 10 kali, satu ulangan terdiri dari 3 kumpulan kalus embriogenik. Peubah yang diamati adalah jumlah embrio somatik fase torpedo yang berhasil terbentuk per klam kalus.

Selanjutnya, nilai radiosensitivitas (LD₂₀ dan LD₅₀) dihitung berdasarkan kemampuan kalus hasil iradiasi yang dapat beregenerasi. Kalus yang mampu beregenerasi mencerminkan embrio somatik yang mampu tumbuh dan berkembang (hidup). Respons regenerasi setelah perlakuan radiasi sinar gamma dianalisis menggunakan program *curve expert 1.3* untuk menentukan nilai LD₂₀ dan LD₅₀.

Analisis Data

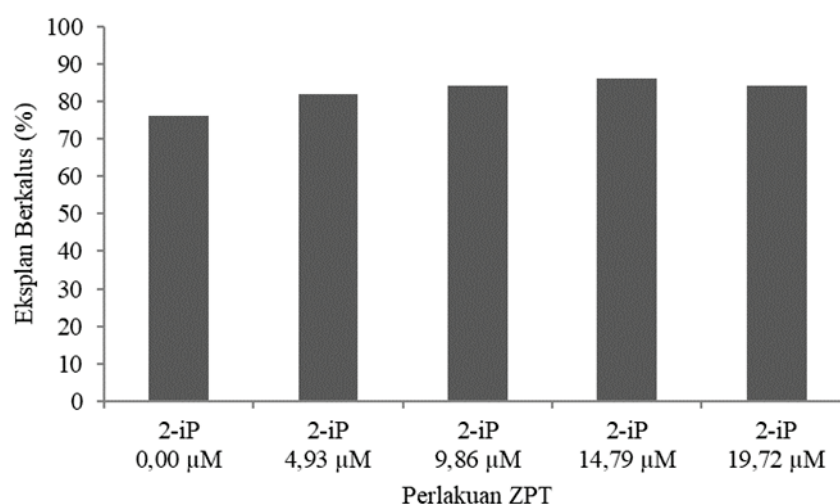
Data yang diperoleh dianalisis ragam, apabila hasilnya berbeda nyata dilanjutkan dengan uji beda rata-rata menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT)

pada taraf 5%. Analisis data dilakukan dengan program SAS 9.1.

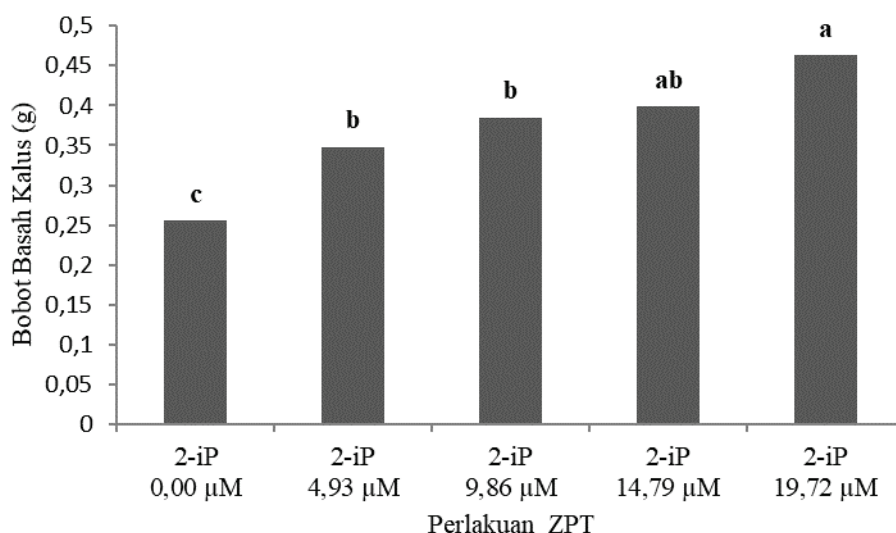
HASIL DAN PEMBAHASAN

Induksi Kalus Kopi Robusta BP 436

Persentase terbentuknya kalus kopi Robusta BP 436 memperlihatkan tidak ada perbedaan yang nyata antar perlakuan yang diuji (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa semua perlakuan yang diuji dapat menginduksi pembentukan kalus. Kalus mulai terbentuk di bekas potongan daun 4 minggu setelah dikulturkan pada media induksi tahap awal. Pembentukan kalus awal pada media induksi ini lebih lama satu minggu dibandingkan dengan hasil penelitian Ibrahim, Hartati, Rubiyo, Purwito, & Sudarsono (2015) pada kopi Arabika, serta hasil penelitian Ibrahim & Hartati (2017) pada kopi Robusta yang menggunakan media dengan kombinasi ZPT 2,4-D 9,04 μM ditambah thidiazuron 13,62 μM atau 22,70 μM , namun sama dengan perlakuan kombinasi lainnya. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Etienne *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa pembentukan kalus awal pada kopi Arabika memerlukan waktu tiga minggu, lebih cepat dibandingkan dengan penelitian Landey *et al.* (2013) yang mendapatkan kalus awal 1 bulan setelah induksi. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kombinasi dan konsentrasi ZPT, serta varietas kopi yang digunakan.



Gambar 1. Persentasi terbentuknya kalus kopi Robusta BP 436 pada beberapa perlakuan zat pengatur tumbuh 2-iP
Figure 1. Percentage of Robusta coffee BP 436 callus formation in several 2-iP growth regulator treatments



Gambar 2. Rataan bobot basah kalus kopi Robusta BP 436 pada beberapa perlakuan zat pengatur tumbuh 2-iP
Figure 2. The average fresh weight of Robusta coffee BP 436 callus in several 2-iP growth regulator treatments

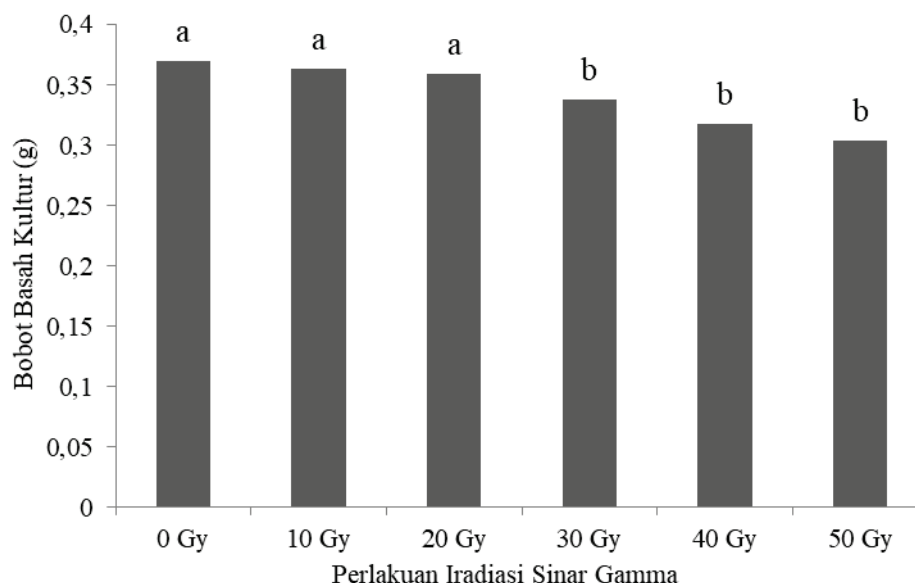
Berdasarkan bobot basah kalus, bobot terbesar ditemukan pada perlakuan kombinasi 2,4-D 4,52 µM ditambah 2-iP 19,72 µM, dan terendah pada 2,4-D 4,52 µM ditambah 2-iP 0,00 µM. Pada Gambar 2 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi 2-iP yang diberikan, penambahan bobot basah semakin meningkat. Hal ini memperlihatkan bahwa penambahan konsentrasi 2-iP lebih dari 19,72 µM dapat menghasilkan kalus yang lebih banyak. Bertambah banyaknya kalus yang terbentuk menjadikan bobot basah semakin meningkat. Pemberian ZPT 2,4-D tanpa penambahan 2-iP memperlihatkan hasil kurang baik jika dibandingkan dengan yang dikombinasikan dengan 2-iP. Berat kalus tanpa pemberian 2-iP terlihat lebih rendah dibandingkan dengan kombinasi antara 2,4-D dan 2-iP. Hal ini dimungkinkan karena sifat morfogenesis pada kultur jaringan sangat tergantung pada rasio antara auksin dan sitokinin yang diberikan. Auksin berperan dalam menstimulasi pertumbuhan sel, sedangkan sitokinin dapat meningkatkan pembelahan, pertumbuhan, dan perkembangan kultur sel tanaman. Kombinasi antar keduanya akan menghasilkan pertumbuhan dan perkembangan sel yang cepat, sehingga dapat terbentuk kalus. Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Arimarsetiowati (2011) dan Ibrahim *et al.* (2015) menunjukkan bahwa pembentukan kalus kopi juga memerlukan kombinasi sitokinin dan auksin.

Kalus kopi Robusta BP 436 yang dihasilkan berwarna putih kekuningan, cokelat, dan sebagian kecil putih seperti kapas. Kalus yang putih kekuningan merupakan kalus embriogenik, sementara kalus yang

cokelat atau putih seperti kapas bukan kalus embriogenik. Kalus yang tidak embriogenik tidak dapat beregenerasi, sehingga tidak dapat digunakan. Warna kalus yang terbentuk pada penelitian ini hampir sama dengan penelitian Wang *et al.* (2018) yang menggunakan ZPT NAA dan thidiazuron. Namun berbeda dengan hasil penelitian Ibrahim & Hartati (2017) pada kopi Robusta klon BP 308 yang menghasilkan kalus berwarna putih kekuningan saja. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis kopi dan komposisi ZPT yang digunakan.

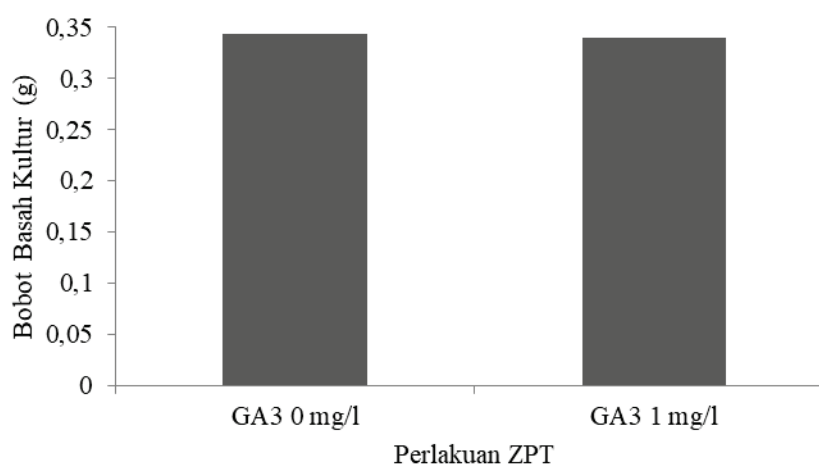
Induksi Mutasi dan Regenerasi Kalus Embriogenik Hasil Mutasi Iradiasi Sinar Gamma

Hasil analisis statistik menunjukkan tidak terdapat interaksi yang nyata antar perlakuan dosis iradiasi sinar gamma dan perlakuan GA₃. Namun, secara tunggal perlakuan dosis iradiasi pada kalus kopi Robusta BP 436 menunjukkan interaksi yang nyata 3 bulan setelah iradiasi, sementara pemberian GA₃ tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Gambar 3 menunjukkan bahwa peningkatan dosis iradiasi dapat menurunkan bobot basah kultur. Hal ini mengindikasikan bahwa dosis iradiasi sinar gamma yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik kopi Robusta BP 436. Penurunan bobot basah kultur juga terlihat pada kalus embriogenik gandum (Setiawan, Khumaida, & Dinarti, 2015) dan kalus tebu (Yasmin *et al.*, 2011) setelah diiradiasi sinar gamma.



Gambar 3. Pengaruh beberapa dosis iradiasi sinar gamma terhadap bobot basah kultur kopi Robusta BP 436 setelah 3 bulan di media regenerasi

Figure 3. Effect of several doses of gamma irradiation on the fresh weight of Robusta coffee BP 436 callus culture after 3 months in regeneration media



Gambar 4. Pengaruh penambahan GA₃ pada bobot basah kultur kopi Robusta BP 436 setelah 3 bulan di media regenerasi

Figure 4. Effect of GA₃ addition on the fresh weight of Robusta coffee BP 436 culture after 3 months in regeneration media

Penambahan GA₃ 1 mg/l pada media kultur selama 3 bulan memperlihatkan hasil yang tidak nyata (Gambar 4). Hal ini diduga proses regenerasi kalus membentuk embrio somatik kopi Robusta BP 436 membutuhkan waktu lebih dari 3 bulan, sehingga pemberian GA₃ yang berperan dalam proses pemecahan dormansi dan perkecambahan belum terlihat pengaruhnya.

Regenerasi kalus hasil perlakuan iradiasi sinar gamma (10, 20, 30, 40, dan 50 Gy), dan kalus yang tidak diiradiasi (kontrol) memperlihatkan adanya perbedaan yang nyata pada perlakuan media yang diuji. Pada kontrol, penambahan GA₃ 1 mg/l dapat

meningkatkan jumlah embrio somatik fase torpedo yang terbentuk secara signifikan, namun tidak pada mutan putatif hasil iradiasi sinar gamma. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya, yaitu penambahan GA₃ 1 mg/l di media regenerasi pada kopi Robusta klon BP 308 dapat meningkatkan jumlah embrio somatik fase torpedo yang terbentuk (Ibrahim & Hartati, 2017).

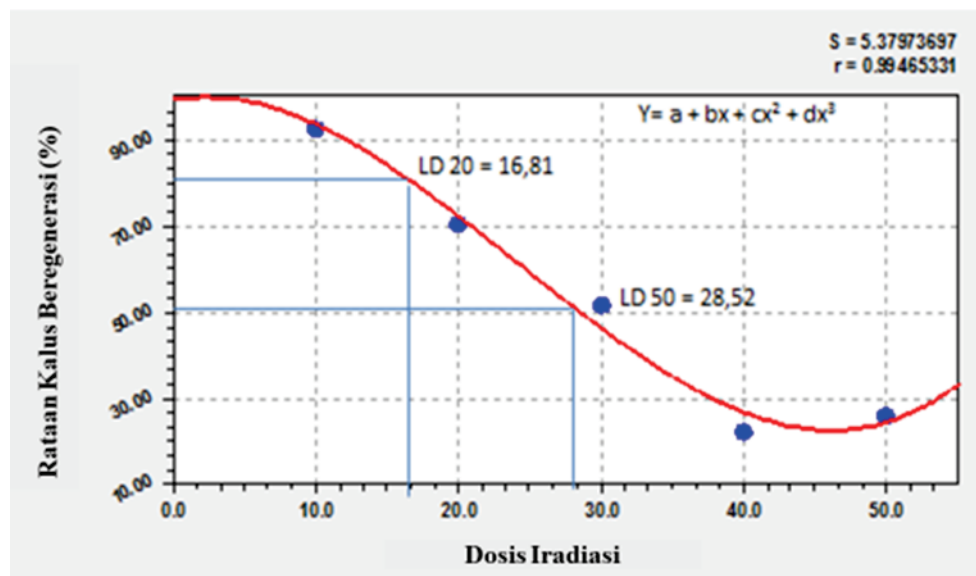
Pada Tabel 1 dapat dilihat, jumlah embrio somatik fase torpedo yang terbentuk menurun seiring dengan meningkatnya dosis iradiasi sinar gamma. Hal ini diduga akibat terjadinya kerusakan organel di dalam sel, sehingga proses aktifitas dan metabolisme sel menjadi terganggu. Kerusakan sel akibat dosis tinggi iradiasi

Tabel 1. Jumlah embrio somatik fase torpedo yang beregenerasi dari kalus embriogenik setelah perlakuan dosis iradiasi sinar gamma
Table 1. The number of somatic embryos of torpedo phase regenerating from the embryogenic callus of Robusta coffee BP 436 after gamma ray irradiation doses treatment

Dosis iradiasi sinar gamma	Jumlah embrio somatik fase torpedo yang terbentuk	
	Kinetine 2 mg/l + GA ₃ 0 m/l	Kinetine 2 mg/l + GA ₃ 1 m/l
0 Gy	42,80 a B	49,70 a A
10 Gy	41,30 a A	44,50 ab A
20 Gy	34,50 b A	39,50 b A
30 Gy	20,70 c A	25,30 c A
40 Gy	17,20 cd A	18,20 c A
50 Gy	9,9 d A	8,90 d A

Keterangan : Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom yang sama dan huruf besar yang sama pada baris yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada taraf 5%

Note : Numbers followed by the same lower case letters on the same row and the same uppercase letters on the same column were not significantly different at DMRT 5%



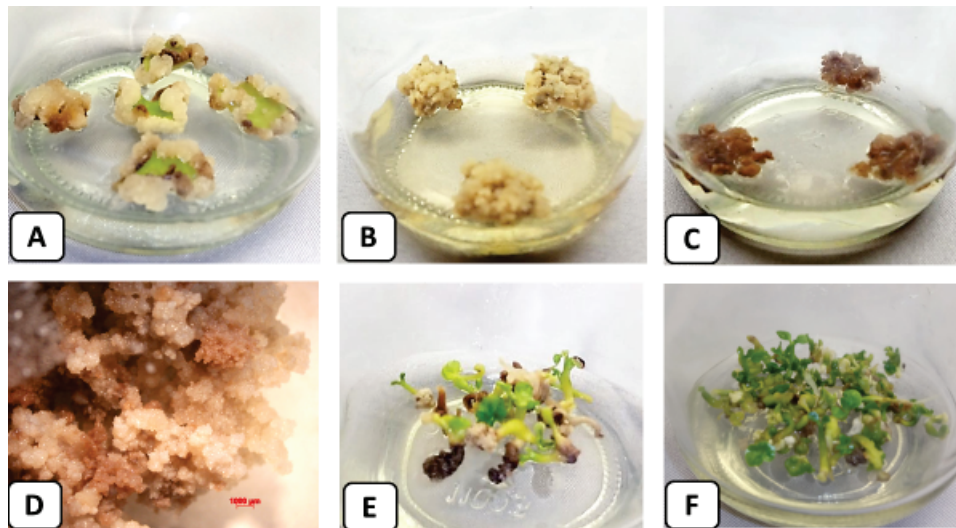
Gambar 5. Persentase kalus kopi Robusta BP 436 yang mampu beregenerasi pada beberapa konsentrasi iradiasi sinar gamma.
Figure 5. Percentage of Robusta coffee BP 436 callus that is regenerating at several concentrations of gamma ray irradiation

diduga dapat mengakibatkan pertumbuhan dan perkembangan kopi Robusta BP 436 menjadi terhambat. Terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan ditunjukkan oleh warna kalus yang menghitam menandakan terjadinya nekrosis (kematian sel). Dosis tinggi iradiasi sinar gamma menghasilkan radikal bebas dalam bentuk hidroksil. Radikal hidroksil/ hidrogen peroksida akan menyebabkan kerusakan fisiologis berupa terhambatnya proses pembelahan dan diferensiasi sel dan kerusakan gen jika radikal hidroksil tersebut menempel pada rantai nukleotida yang menyebabkan rusaknya DNA (Suharsono, Muhammad, & Purwito, 2009).

Nilai LD₂₀ dan LD₅₀ dari persentase kalus kopi Robusta BP 436 yang mampu beregenerasi didapatkan dalam bentuk kurva polinomial dengan persamaan

$Y = a + bx + cx^2 + dx^3$. Dari persamaan tersebut didapatkan nilai LD₂₀ berada pada iradiasi sinar gamma 16,81 Gy, sementara LD₅₀ pada dosis 28,52 Gy (Gambar 5).

Nilai LD₂₀ dan LD₅₀ pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil yang diperoleh Suhesti *et al.* (2015) pada kalus tebu, yaitu 12,57 Gy dan 28,88 Gy. Penurunan proliferasi kalus tebu juga dilaporkan oleh Yasmin *et al.* (2011) pada iradiasi sinar gamma 20 Gy. Nilai LD₅₀ kopi Robusta BP 436 berada pada dosis iradiasi sinar gamma 28,52 Gy. Pada penelitian ini dosis iradiasi yang sangat mendekati nilai LD₅₀ adalah dosis 30 Gy. Keragaan kalus embrio somatik yang mampu beregenerasi dan berkecambah dari populasi mutan putatif pada perlakuan dosis iradiasi 30 Gy dapat dilihat pada Gambar 6 D. Kalus berwarna hitam adalah kalus



Gambar 6. Keragaan pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik kopi Robusta BP 436 hasil iradiasi sinar gamma: (A) kalus dari eksplan daun kopi, (B) kalus embriogenik berhasil tumbuh dan berkembang dari perlakuan iradiasi 10 Gy, (C) kalus tidak berhasil tumbuh dan berkembang dari perlakuan iradiasi 50 Gy, (D) kalus yang diiradiasi 30 Gy di bawah mikroskop (kalus berwarna hitam adalah kalus yang mengalami nekrosis), (E) embrio somatik kopi perlakuan iradiasi 30 Gy fase kecambah, (F) embrio somatik kopi perlakuan kontrol (tidak diiradiasi) fase kecambah

Figure 6. Performance of growth and development of somatic embryos of Robusta coffee BP 436 generated from gamma ray irradiation: (A) calli from explants of coffee leaves, (B) embryogenic calli successfully grew and developed from 10 Gy irradiation treatment, (C) calli did not grow and develop from 50 Gy irradiation treatment, (D) calli irradiated 30 Gy under a microscope (black calli are calli with necrosis), (E) somatic embryo of coffee clone with irradiation treatment of 30 Gy at germination phase, (F) coffee somatic embryo of coffee clone in control treatment (not irradiated) at germination phase

yang mengalami nekrosis, sementara kalus yang berwarna putih kekuningan merupakan kalus yang mampu bertahan. Sel-sel kalus yang mengalami kerusakan disebabkan oleh paparan dari sinar gamma. Keragaan kecambah kopi Robusta BP 436 yang diberi perlakuan iradiasi sinar gamma 30 Gy dan kontrol (tanpa iradiasi) dapat dilihat pada Gambar 6 E dan 6 F.

Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mahadevamma, Sahijram, Kumari, & Shankarappa (2012) pada kalus papaya, juga mendapatkan nilai LD_{50} di sekitar 30 Gy. Pada tanaman sagu pembentukan embrio somatik terendah diperoleh pada kontrol dan 25 Gy (Riyadi & Sumaryono, 2016). Sementara Rohani, Kamal, Rajinder, & Mohd-Nazir (2012) mendapatkan nilai LD_{50} pada 40 Gy pada kalus embriogenik kelapa sawit yang berasal dari eksplan embrio zygotik.

Nilai LD_{50} dari kalus kopi Robusta BP 436 yang diperoleh belum tentu sama jika iradiasi sinar gamma dilakukan pada genotipe kopi Robusta yang berbeda. Perbedaan nilai LD_{50} telah dilaporkan oleh Setiawan *et al.* (2015) pada kalus gandum varietas dewata, nias, dan selayar, dengan nilai LD_{50} secara berurutan adalah 33,63; 33,05; dan 24,29. Selain itu, perbedaan sumber eksplan juga dilaporkan dapat memengaruhi nilai LD_{50} . Perbedaan ini terlihat pada kalus embriogenik jeruk yang diiradiasi oleh Ling, Chia, Hussein, & Harun (2008) berada di angka 27 Gy,

sementara Agisimanto, Noor, Ibrahim, & Mohamad (2016) meradiasi kalus jeruk dari eksplan nucellus menunjukkan penurunan pertumbuhan kalus pada 40 Gy.

Selain nilai LD_{50} , radiosensitivitas juga dapat diamati dari adanya hambatan pertumbuhan, terjadinya mutasi somatik, patahan kromosom, serta perubahan jumlah dan ukuran kromosom (Herison, Sutjahjo, & Aisyah, 2008). Hasil penelitian terdahulu menyatakan bahwa perbedaan tingkat radiosensitivitas suatu eksplan terhadap iradiasi dipengaruhi oleh bentuk fisik (besar kecil) dan morfologi (Roux, Brunner, Morpurgo, & Van Duren, 1994), kondisi fisiologis, genetik, serta faktor lingkungan, seperti kadar air eksplan, penyimpanan pasca iradiasi, dan suhu saat inkubasi (Soeranto, 2003). Selain itu, faktor yang mengakibatkan perbedaan nilai LD_{50} adalah kandungan kadar oksigen dan molekul air (H_2O) dalam materi yang diiradiasi. Semakin banyak oksigen dan H_2O , maka akan semakin banyak pula radikal bebas yang terbentuk, sehingga tanaman menjadi lebih peka terhadap iradiasi sinar gamma.

KESIMPULAN

Media terbaik untuk menginduksi kalus kopi Robusta BP 436 adalah media $\frac{1}{2}$ MS yang diberi 2,4-D

4,52 μM + 2-iP 19,72 μM . Penambahan GA_3 1 mg/l pada media regenerasi dapat meningkatkan jumlah embrio somatik yang mampu beregenerasi, namun tidak pada kalus yang dimutasi sinar gamma. Penggunaan iradiasi sinar gamma di atas 30 Gy dapat menghambat penambahan bobot basah kultur. Embrio somatik paling banyak dihasilkan pada perlakuan tanpa iradiasi (0 Gy) dan menurun pada dosis di atas 10 Gy. Nilai LD_{20} dan LD_{50} dari kopi Robusta BP 436 adalah 16,81 dan 28,52 Gy.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Badan Litbang Pertanian, Kementerian Pertanian RI yang telah mendanai penelitian ini melalui program KP4S tahun anggaran 2017–2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Agisimanto, D., Noor, N. M., Ibrahim, R., & Mohamad, A. (2016). Gamma irradiation effect on embryogenic callus growth of *Citrus reticulata* cv. *limau madu*. *Sains Malaysiana*, 45(3), 329–337.
- Aisyah, S. I., Aswidinnor, H., Saefuddin, A., Marwoto, B., & Sastrosumarjo, D. S. (2009). Induksi mutasi pada stek pucuk anyelir (*Dianthus caryophyllus* Linn.) melalui iradiasi sinar gamma. *Jurnal Agronomi Indonesia*, 37(1), 62–70.
- 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.
- Asadi. (2013). Pemuliaan mutasi untuk perbaikan terhadap umur dan produktivitas pada kedelai. *Jurnal AgroBiogen*, 9(3), 135–142. <https://doi.org/10.1128/JB.01278-12>
- Bermawie, N., Meilawati, N., Purwiyanti, S., & Melati. (2015). Pengaruh iradiasi sinar gamma (^{60}Co) terhadap pertumbuhan dan produksi jahe putih kecil (*Zingiber officinale* var. *amarum*). *Jurnal Littri*, 21(2), 47–56.
- Bibi, S., Khan, I. A., Bughio, H. U. R., Odhano, I. A., Asad, M. A., & Khatri, A. (2009). Genetic differentiation of rice mutants based on morphological traits and molecular marker (RAPD). *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), 737–743.
- Datta, S. (2000). Mutation studies on garden Chrysanthemum. *Scientific Horticulture*, 7, 159–199.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. (2017). *Statistik perkebunan Indonesia 2015-2017: Kopi*. Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan Kementerian Pertanian.
- Etienne, H., Breton, D., Breitler, J.-C., Bertrand, B., Déchamp, E., Awada, R., ... Ducos, J.-P. (2018). Coffee somatic embryogenesis: How did research, experience gained and innovations promote the commercial propagation of elite clones from the two cultivated species? *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01630>
- Herison, C., Sutjahjo, S. H., & Aisyah, S. I. (2008). Induksi mutasi melalui iradiasi sinar gamma terhadap benih untuk meningkatkan keragaman populasi dasar jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal Akta Agrosia*, 11(1), 57–62.
- Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. R. S., Rubiyo, 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., & Hartati, S. (2017). Peningkatan induksi kalus embriogenik dan konversi embrio somatik kopi Robusta klon BP 308. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*, 4(3), 121–132.
- Jain, S. M. (2010). Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2), 88–106.
- Kiong, A. L. P., Lai, A. G., Hussein, S., & Harun, A. R. (2008). Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, Vol. 2, pp. 135–149.
- Landey, R. B., Cenci, A., Georget, F., Bertrand, B., Camayo, G., Dechamp, E., ... Etienne, H. (2013). High genetic and epigenetic stability in coffee Arabica plants derived from embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. *PLOS ONE*, 8(2), 1–15.
- Lestari, E. G. (2012). Combination of somaclonal variation and mutagenesis for crop improvement. *Jurnal AgroBiogen*, 8(1), 38–44. <https://doi.org/10.21082/jbio.v8n1.2012.p38-44>
- Ling, A. P., Chia, J. Y., Hussein, S., & Harun, A. R. (2008). Physiological responses of *Citrus sinensis* to gamma irradiation. *World Applied Sciences Journal*, 5(1), 12–19.
- Mahadevamma, M., Sahijram, L., Kumari, V., & Shankarappa, T. H. (2012). In vitro mutation studies in papaya (*Carica papaya* L.). *CIBTech Journal of Biotechnology*, 1(1), 49–55.

- Mba, C. (2013). Induced mutation unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy*, 3, 200–231.
- Penna, S., & Jain, S. M. (2017). Mutant resources and mutagenomics in crop plants. *Journal of Food and Agriculture*, 29(9), 651–657. <https://doi.org/10.9755/efjfa.2017.v29.i9.86>
- Puslitkoka. (2016). *Kopi: Sejarah, Botani, Proses, Produksi, Pengolahan, Produk Hilir, dan Sistem Kemitraan* (T. Wahyudi, Ed.). Yogyakarta: Gadjah Mada University.
- Riyadi, I., & Sumaryono. (2016). Effect of gamma irradiation on the growth and development of sago palm (*Metroxylon sagu* Rottb.) Calli. *Indones. J. Agric. Sci.*, 17(1), 35–40.
- Rohani, O., Kamal, S. R., Rajinder, S., & Mohd-Nazir, B. (2012). Mutation induction using gamma irradiation on oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) cultures. *Journal of Oil Palm Research*, 24(AUGUST), 1448–1458.
- Roslim, D. I., Herman, & Fiatin, I. (2015). Lethal dose 50 (LD50) of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) cultivar kampar. *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 47(4), 510–516.
- Roux, N., Brunner, H., Morpurgo, R., & Van Duren, M. (1994). The Improvement and Testing of Musa: A global Partnership. In D. Jones (Ed.), *First global Conference of the International Musa Testing Program*. Montpellier: Parc Scientifique Agropolis.
- Sari, L., Purwito, A., Sopandie, D., Purnamaningsih, R., & Sudarmanowati, E. (2015). Pengaruh iradiasi sinar gamma pada pertumbuhan kalus dan tunas tanaman gandum (*Triticum aestivum* L.). *Ilmu Pertanian*, 18(1), 44–50.
- Setiawan, R. B., Khumaida, N., & Dinarti, D. (2015). Induksi mutasi kalus embriogenik gandum (*Triticum aestivum* L.) melalui iradiasi sinar gamma untuk toleransi suhu tinggi. *Jurnal Agronomi Indonesia*, 43(1), 36–44. cek penulisan
- Singh, N., & Balyan, H. (2009). Induced mutations in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) CV. 'Kharchia 65' for reduced plant height and improve grain quality traits. *Advances in Biological Research*, 3(5–6), 215–221.
- Soeranto, H. (2003). Peran iptek nuklir dalam pemuliaan tanaman untuk mendukung industri pertanian. In *Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir* (pp. 308–316). Yogyakarta. lihat cara penulisan prosiding
- Soeranto, H. (2012). Pemanfaatan Teknologi Nuklir untuk Pemuliaan Sorghum. In *Workshop on the Current Status and Challenges in Sorghum Development in Indonesia* (p. 120p.). Bogor: Seameo Biotrop.
- Suharsono, Muhammad, A., & Purwito, A. (2009). Pembentukan tanaman cabai haploid melalui induksi ginogenesis dengan menggunakan serbuk sari yang diradiasi sinar gamma. *J.Agron.Indonesia*, 37(2), 123–129.
- Suhesti, S., Khumaida, N., Wattimena, G. A., Syukur, M., Husni, A., & Hadipoentyanti, E. (2015). Gamma irradiation and in vitro selection could increase drought tolerance in sugarcane. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 23(2), 370–380.
- Tah, P. R., & Saxena, S. (2009). Induced synchrony in pod maturity in mungbean (*Vigna radiata*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(3), 321–324.
- U.S. Environmental Protection Agency. (2010). Gamma radiation scanning sampling and analysis plan area IV radiological study Santa Susana Field Laboratory Ventura County, California. San Francisco.
- Wang, Y.C., Lin, M.Z., Huang, B., Chung, H. & Chen, J.C. 2018. Thidiazuron enhanced somatic embryogenesis from callus lines of Arabica coffee and subsequent plant regeneration. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 60(2), 35–44. <https://doi.org/10.24425/118053>
- Yalindua, A., Sudarsono, Setiawan, A., & Bintoro, H. M. H. (2014). The application of mutation induction by gamma irradiation on cultivars yam (*Dioscorea alata* L.) from Banggai Island, Indonesia. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 5(2), 46–54.
- Yamaguchi, H., Shimizu, A., Degi, K., & Morishita, T. (2008). Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum. *Breeding Science*, 58, 331–335. <https://doi.org/10.1270/Jsbs.58.331>
- Yasmin, S., Khan, I. A., Khatri, A., Seema, N., Siddiqui, M. A., & Bibi, S. (2011). Plant regeneration from irradiated embryogenic callus of sugarcane. *Pakistan Journal of Botany*, 43, 2423–2426.
- Yunita, R., Khumaida, N., Sopandie, D., & Mariska, I. (2016). Pengaruh iradiasi sinar gama terhadap pertumbuhan dan regenerasi kalus padi varietas ciherang dan inpari 13. *Jurnal Agro Biogen*, 10(3), 101–108.