

Embriogenesis somatik pada kultur *in vitro* daun kopi robusta (*coffea canephora* var. Robusta chev.)

Embriogenesis somatik pada kultur *in vitro* daun kopi robusta (*coffea canephora* var. Robusta chev.)

Pinta MURNI¹⁾

¹⁾Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jambi. Jl Jambi Muara Bulian Km 15 Mendalo Darat, Jambi

ABSTRACT. This research aims to induce tissue cells of robusta coffee leaves (*Coffea canephora* var. Robusta Chev.) for embryogenesis through the addition of growth regulators kinetin and 2,4-D. The growth medium used is a solid Murashige-Skoog medium (MS). The added growth regulators are A = 10^{-7} Kinetin without 2,4-D, E = 5×10^{-6} M Kinetin and 2.5×10^{-5} M 2,4-D; H = 5×10^{-6} M Kinetin and 5×10^{-5} M 2,4-D, I = 7.5×10^{-6} M Kinetin and 5×10^{-5} M 2,4-D. Explants used were the second leaf from top branch ortotroph of coffee plants with a size of about 0.5 x 1.0 cm. Observations were made on the percentage of live explants, explant growth response including the formation of callus, organogenesis, and embryogenesis. The results showed that the planted explants are 100% alive, the growth response in the form of direct somatic embryogenesis occurred on the addition of Kinetin 10^{-7} without 2,4-D. Other Treatment, E produced a response in the form of greenish compact callus, while two other treatments, H and I, form whitish crumb/fragile structured callus. Thus, it was concluded that *in vitro* culture of leaf tissue of Robusta coffee (*Coffea canephora* var. Robusta Chev.) on Murashige-Skoog (MS) medium with the addition of kinetin growth regulators and 2,4-D at different concentrations produce higher different growth rate. Response of growth that occurs is in the form of direct somatic embryogenesis, compact and crumb/fragile structured callus. .

Keyword: somatic embryogenesis, organogenesis, *in-vitro* culture, Robusta coffee

ABSTRAK. Penelitian ini bertujuan menginduksi sel-sel jaringan daun kopi robusta (*Coffea canephora* var. robusta Chev.) untuk embryogenesis melalui perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4-D. Media pertumbuhan yang digunakan media padat Murashige-Skoog (MS). Zat pengatur tumbuh yang ditambahkan adalah A = 10^{-7} Kinetin dan tanpa 2,4-D ; E = 5×10^{-6} M Kinetin dan $2,5 \times 10^{-5}$ M 2,4-D ; H = 5×10^{-6} M Kinetin dan 5×10^{-5} M 2,4-D ; I = $7,5 \times 10^{-6}$ M Kinetin dan 5×10^{-5} M 2,4-D. Eksplan yang digunakan adalah daun kedua dari pucuk cabang ortotrof tanaman kopi dengan ukuran sekitar 0,5 x 1,0 cm. Pengamatan dilakukan terhadap persentase hidup eksplan, respon pertumbuhan eksplan yang meliputi pembentukan kalus, organogenesis, dan embriogenesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan yang ditanam hidup 100%, respon pertumbuhan berupa embriogenesis somatik langsung terjadi pada perlakuan A yaitu pada penambahan 10^{-7} Kinetin tanpa 2,4-D. Perlakuan lainnya E menghasilkan respon tumbuh berupa kalus yang berstruktur kompak berwarna kehijauan, sedangkan dua perlakuan lainnya H dan I berupa kalus yang berstruktur remah/fragil berwarna keputihan. Dengan demikian, disimpulkan bahwa kultur *in vitro* jaringan daun kopi robusta (*Coffea canephora* var. robusta Chev.) pada medium Murashige-Skoog (MS) dengan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4-D pada konsentrasi yang berbeda menghasilkan respon pertumbuhan yang berbeda. Respon pertumbuhan yang terjadi berupa embriogenesis somatik secara langsung, kalus yang berstruktur kompak dan remah/fragil.

Kata kunci: embriogenesis somatik, organogenesis, kultur *in vitro*, kopi robusta

PENDAHULUAN

Teknik kultur *in vitro* dari berbagai jenis tumbuhan akhir-akhir ini telah banyak dilakukan termasuk untuk jenis kopi (*Coffea sp.*). Teknik ini didasarkan atas sifat totipotensi sel tumbuhan yang berarti setiap sel tumbuhan mampu menurunkan sifat dan mempunyai potensi yang sama dengan induknya untuk tumbuh dan berkembang bila diberikan lingkungan yang sesuai. Respon pertumbuhan secara umum dalam kultur *in vitro* meliputi diferensiasi langsung maupun tidak langsung yaitu melalui pembentukan kalus. Kalus merupakan hasil antara dalam morfogenesis, meliputi organogenesis dan embriogenesis dan akhir dari proses ini adalah terbentuknya planlet (Thorpe, 1981).

Banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur *in vitro*, baik faktor dalam seperti kondisi sampel yang dijadikan sebagai eksplan maupun faktor luar seperti media pertumbuhan yang digunakan. Media perumbuhan merupakan campuran berbagai garam mineral, air, asam amino, vitamin, gula, zat pengatur tumbuh, dan pematid. Media pertumbuhan Murashige Skoog (MS) merupakan salah satu media yang penggunaannya lebih luas dalam kultur *in vitro* terutama untuk tumbuhan berkayu (Gunawan, 1995).

Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh berperan dalam mengontrol pertumbuhan dan morfogenesis (Wareing dan Phillips, 1973). Organogenesis dan embriogenesis yang berasal dari kalus telah dihasilkan dari berbagai jenis tanaman yang dikulturkan dan embrio dapat dihasilkan dari sel-sel somatik ataupun dari sel gamet eksplan (Thorpe, 1981). Menurut Halperin dalam Bhojwani dan Razdan (1983) secara anatomis dan histologis sel kalus yang dihasilkan dari kultur dapat dibedakan dalam dua tipe. Tipe yang pertama adalah sel yang mempunyai vakuola besar dan banyak, biasanya kurang ampu untuk membentuk embrioid dan tipe kedua adalah sel yang mempunyai sitoplasma banyak, biasanya mampu membentuk embrioid. Umumnya induksi yang terjadi akibat pemberian zat pengatur tumbuh dalam kultur *in vitro* dapat menyebabkan terjadinya pembelahan sel saja sehingga menghasilkan kalus atau induksi yang menyebabkan terjadinya modifikasi gen sehingga sel mengalami morfogenesis dan diferensiasi termasuk embriogenesis somatik (Street, 1973). Embrio somatik dicirikan adanya calon akar dan pucuk pada satu sumbu (Gunawan, 1995).

Selanjutnya Rianawati, dkk (2009) menyatakan bahwa embriogenesis somatik pada beberapa eksplan tanaman dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung atau dapat terjadi keduanya pada eksplan yang sama

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media pertumbuhan Murashige-Skoog (MS) bentuk padat, eksplan jaringan daun kedua dari pucuk cabang ortotrof tanaman kopi robusta, zat pengatur tumbuh Kinetin dan 2,4-D, sterilan klorox atau bayclin, alkohol, aluminium foil, NaOH, HCl, detergen, dan spiritus. Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, botol kultur, oven, autoklaf, hot plate dan magnetic stirrer, pH meter, timbangan analitis, laminar air flow, lampu spritus, pinset, pisau dan scalpel, mikroskop, dan kamera.

Alat-alat gelas, botol kultur, akuades, dan media pertumbuhan semuanya digunakan dalam kondisi aseptik dan disterilkan dengan autoklaf. Eksplan disterilkan dalam laminar air flow dengan menggunakan bayclin/klorox, alcohol 70%, dan akuades untuk pembilas.

Sebelum ditanam eksplan yang sudah steril dipotong dengan ukuran sekitar 0,5 x 1,0 cm. Selanjutnya ditanam pada media pertumbuhan sesuai dengan perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh yaitu: 10⁻⁷M kinetin tanpa 2,4-D (A), 5 x 10⁻⁶M kinetin dan 2,5 x 10⁻⁵M 2,4-D (E), 5 x 10⁻⁶M kinetin dan 5 x 10⁻⁵M 2,4-D (H) dan 7,5 x 10⁻⁶M kinetin dan 5 x 10⁻⁵M 2,4-D (I)

Setelah penanaman, sampel disimpan dalam gelap selama 2 x 24 jam, selanjutnya dipelihara di rak kultur. Pengamatan dilakukan terhadap persentase hidup eksplan, respon pertumbuhan yang dapat dilihat secara visual, dan pengamatan secara mikroskopis dari hasil pertumbuhan. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Pertumbuhan Eksplan. Hasil pengamatan terhadap eksplan sampai tiga minggu masa tanam, menunjukkan bahwa semua eksplan yang ditanam tetap hidup. Eksplan yang masih hidup dicirikan dengan adanya bagian daun (eksplan) yang masih hijau dan adanya respon pertumbuhan berupa kalus dan butiran kecil warna keputihan pada sebagian eksplan. Dengan demikian, persentase hidup

eksplan yang ditanam adalah 100%, data selengkapnya disajikan pada Tabel berikut. Data ini menunjukkan bahwa sel-sel penyusun jaringan daun yang dijadikan eksplan dapat menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh yang diberikan dalam media pertumbuhan, sehingga terjadi metabolisme dan sel tetap hidup dan selanjutnya terjadi pertumbuhan yang dapat diamati dari respon pertumbuhannya.

Respon Pertumbuhan Eksplan. Pengamatan setelah tiga minggu masa tanam, menunjukkan bahwa terjadi respon pertumbuhan yang berbeda dari perlakuan yang diberikan. Respon pertumbuhan yang diamati secara visual adalah pembentukan embrio somatik langsung dan kalus. Selengkapnya disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase Hidup dan Respon Pertumbuhan Eksplan Daun Kopi (*Coffea canephora* var. *robusta* Chev.) pada Umur Tiga Minggu Setelah Tanam

Perlakuan	Persentase hidup (%)	Respon pertumbuhan	Keterangan
A	100	Embriogenesis langsung	-
E	100	Kalus	SK, WKH
H	100	Kalus	SR, WKP, LB
I	100	Kalus	SR, WKP

Keterangan :

SK = Struktur kalus kompak, SR = Struktur kalus remah/fragi, WKH = Warna kalus putih kehijauan
WKP = Warna kalus putih, LB = Ukuran kalus lebih besar dari perlakuan lainnya

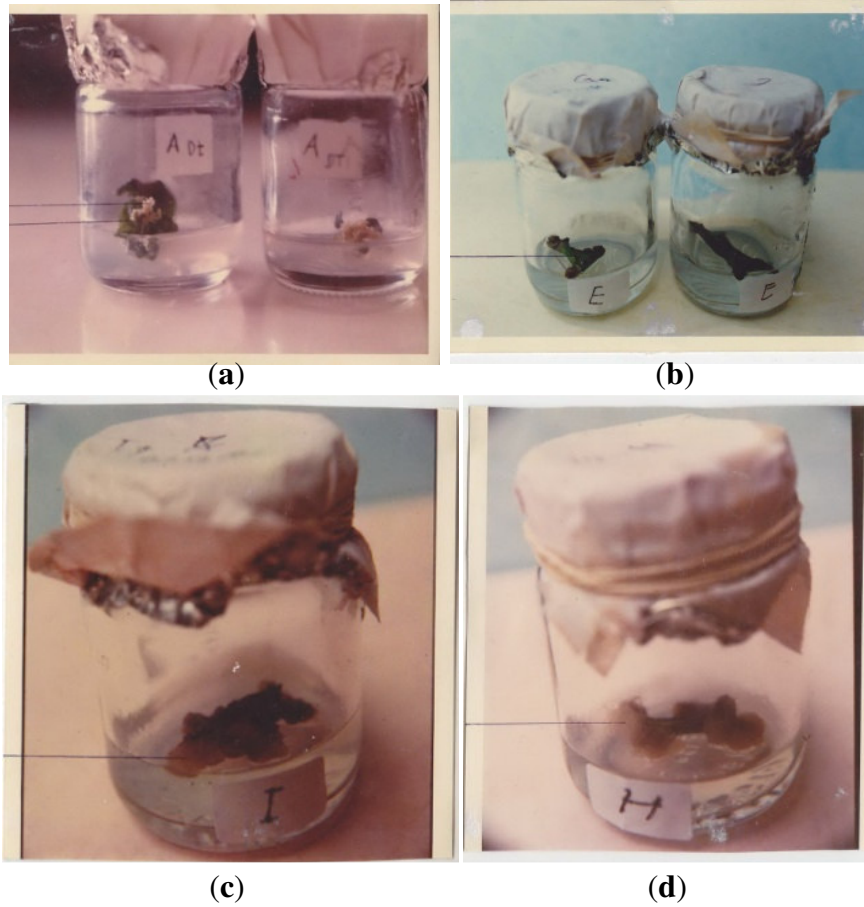
Berdasarkan hasil pengamatan, menunjukkan bahwa konsentrasi dan jenis zat pengatur tumbuh yang berbeda, memberikan respon pertumbuhan yang berbeda. Pemberian 10^{-7} M kinetin tanpa auksin pada perlakuan A menginduksi sel-sel jaringan daun untuk membentuk embrio somatik langsung (Gambar 1.a). Selanjutnya pada perlakuan E (5×10^{-6} M kinetin dan $2,5 \times 10^{-5}$ M 2,4-D) menghasilkan kalus yang berstruktur kompak (Gambar 1.b.), perlakuan H (5×10^{-6} M kinetin dan 5×10^{-5} M 2,4-D), dan perlakuan I ($7,5 \times 10^{-6}$ M kinetin dan 5×10^{-5} M 2,4-D) menghasilkan kalus yang berstruktur remah atau fragil (Gambar 1.c dan d.). Perbedaan respon tumbuh ini terjadi karena perubahan keseimbangan zat pengatur tumbuh dalam sel jaringan eksplan akibat penambahan zat pengatur tumbuh secara eksogen. Perubahan keseimbangan antara zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin mengakibatkan terjadinya perubahan fisiologis sel termasuk perubahan metabolismenya, sehingga menghasilkan respon tumbuh yang berbeda. Hasil penelitian Rianawati, dkk (2009) menunjukkan bahwa embrio somatik dapat diinduksi melalui tahapan inisiasi kalus, media yang paling baik untuk inisiasi kalus adalah MI-3 yang mengandung thidiazuron 0,1 mg/l dan 10 mg/l 2,4-D. Menurut

Wattimena (1992) morfogenesis dari eksplan bergantung dari interksi antara auksin dan sitokinin, selanjutnya dinyatakan Salisbury dan Ross (2000) bahwa kinetin adalah zat pengatur tumbuh yang sangat aktif dari kelompok sitokinin, dan dinyatakan oleh (Smith, 1992) pengaruh sitokinin dalam kultur *in vitro* antara lain pembelahan sel, proliferasi dan morfogenesis pucuk.

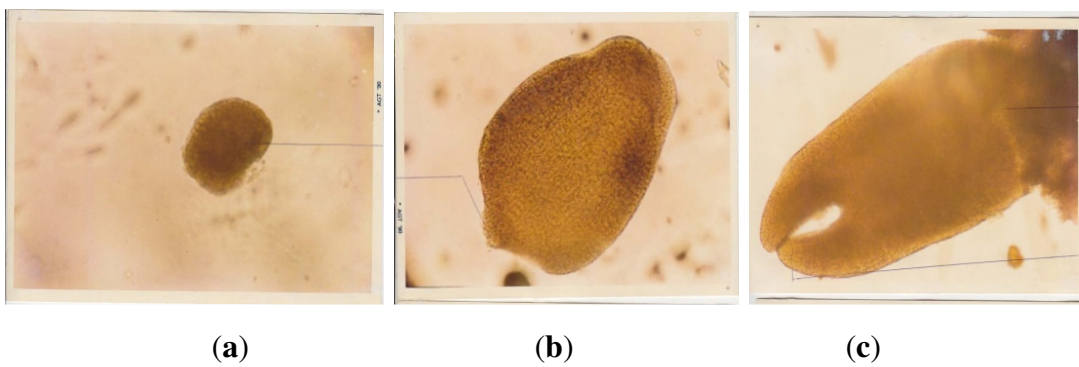
Pengamatan Mikroskopis. Pengamatan mikroskopis hasil pertumbuhan eksplan menunjukkan bahwa pada perlakuan A ditemukan embrio somatik yang berada pada fase-fase embriogenesis yang berbeda-beda. Fase yang ditemukan adalah fase bulat (globular), fase hati (heart), dan fase torpedo yang mulai memperlihatkan adanya calon pucuk dan akar. (Gambar 2.). Perlakuan lainnya E, H, dan I menunjukkan adanya kumpulan sel-sel parenkim yang terdiri dari beberapa bentuk dan ukuran sel (Gambar 3.a).

Pengamatan selanjutnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik, menunjukkan bahwa pada umur delapan minggu setelah tanam embrio tersebut sudah

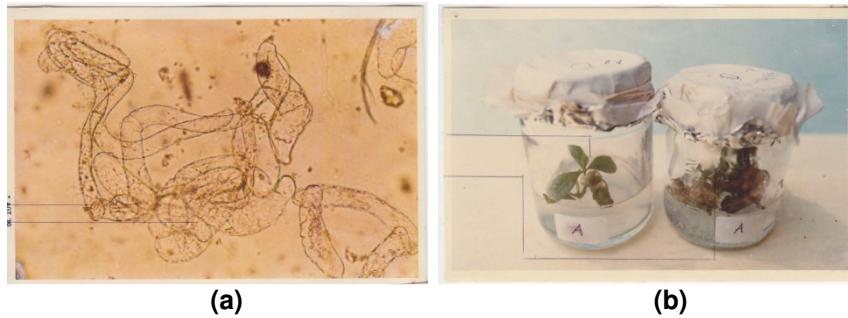
membentuk tumbuhan secara utuh (planlet) seperti disajikan pada Gambar 3.b.



Gambar 1. Respon pertumbuhan eksplan daun kopi : a. embriogenesis somatik langsung, b. kalus dengan struktur kompak, c. kalus dengan struktur remah, dan d. kalus dengan struktur lebih remah



Gambar 2. Fase embriogenesis somatik langsung: (a). fase globular, (b). fase heart, dan ©. fase torpedo



Gambar 3. Sel-sel dari kalus yang remah langsung (a) dan planlet dari embriogenesis somatik (b)

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa kultur *in vitro* jaringan daun kopi robusta (*Coffea canephora* var. robusta Chev.) pada medium Murashige-Skoog (MS) dengan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4-D pada konsentrasi yang berbeda menghasilkan respon pertumbuhan yang berbeda. Respon pertumbuhan yang terjadi berupa embriogenesis somatik secara langsung, kalus yang berstruktur kompak dan remah/fragil.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani, S.S dan M. K. Razdan.** 1983. Plant Tissue Culture Theory and Practice. Elvisier. Amsterdam.
- Gunawan, L.W.** 1995. Teknik Kultur In Vitro dalam Hortikultura. Penebar Swadya. Bogor.
- Rianawati, S., Agus, P., Budi, M., Ridho, K., dan Suryanah** 2009. Embriogenesis somatik dari eksplan daun angrek *Phalaenopsis* sp L. Jurnal Agronomi Indonesia (Indonesian Journal of Agronomy). Perhimpunan Agronomi Indonesia dan Departemen Agronomi dan Hortikultura Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor. Vol. XXXVII No. 3
- Salisbury, F.B dan C.W. Ross.** 2000. Fisiologi Tumbuhan. Jilid Tiga. Terjemahan oleh Ratna Dewi Lukman. ITB. Bandung.
- Smith, H.R.** 1992. Plant Tissue Culture Techniques and Experiments. Second Edition. Academic Press. New York.
- Street, H.E.** 1973. Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell Scientific Publications. Oxford. Melbourne.
- Thorpe, T.A.** 1981. Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. New York.
- Wareing, P.F dan I.D.J. Phillips.** 1973. The Control of Growth and Differentiation in Plants. First Edition. Pergamon Press. Oxford.
- Wattimena, G.A.** 1992. Bioteknologi Tanaman. Dirjen Dikti. Pusat Antar Universitas. Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.