

REPRODUKSI EMBRIO SOMATIK KOPI ARABIKA  
DENGAN MENGGUNAKAN BAP DAN KINETIN SERTA REGENERASI  
PLANTLET DENGAN MENGGUNAKAN Ca-P DAN BIOTIN<sup>1)</sup>

SOMATIC EMBRYO PRODUCTION OF ARABICA COFFEE  
WITH BAP AND KINETIN AND PLANTLET REGENETION  
WITH Ca-P AND BIOTIN

Priyono dan S. Danimihardja<sup>2)</sup>

ABSTRACT

The effects of cytokinin on somatic embryo reproduction of Arabica coffee has been studied *in vitro* using the USDA 230762 clone. The success of reproduction of 58.5 up to 100 percent was achieved. The greatest number of somatic embryo was produced on media containing 4 mg/l BAP. On that media about 105.3 embryoids could be produced directly without passing callus stage from each explant. A part of the embryos (33.3 - 83.3 percent) has been successfully developed into plantlet. The success of this stage was determined by Ca-P and biotin. The highest percentage of plantlet development was 83.3 percent, while maximum number of roots per plantlet was observed on media containing 10 mg/l Ca-P and 0.05 mg/l biotin. Several plantlets have been transferred into the soil medium.

RINGKASAN

Pengaruh sitokinin pada reproduksi embrio somatik telah dipelajari pada kultur embrio somatik kopi arabika klon USDA 230762 secara *in vitro*. Embrio somatik (58,5 - 100 %) dapat mengalami reproduksi pada media yang dicoba. Jumlah terbanyak embrio somatik dihasilkan dari media yang mengandung 4 mg/l BAP. Pada media tersebut sebanyak 105,3 embrioid dapat dihasilkan tanpa melalui fase induksi kalus dari satu eksplan embrio. Sebagian embrio (33,3 - 83,3 %)

---

1) Disampaikan pada Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer Untuk Industri PAU Bioteknologi IPB, Bogor, 10 - 11 Desember 1991.

2) Staf Peneliti Pusat Penelitian Perkebunan Jember

telah berhasil ditumbuhkan menjadi plantlet. Keberhasilan tahap ini dipengaruhi oleh Ca-P dan biotin. Prosentase tertinggi embrio yang mampu tumbuh menjadi plantlet (83,3%) maupun jumlah terbanyak akar/plantlet (18,3) diperoleh dari media yang mengandung 10 mg/l Ca-P dan 0,05 mg/l biotin. Sebagian plantlet telah berhasil ditumbuhkan pada media tanah.

#### PENDAHULUAN

Kopi arabika adalah komoditas komersial yang digunakan untuk menghasilkan kopi instant. Keragaman genetik di lapang sering ditemui, karena sampai saat ini bahan tanam yang digunakan berasal dari benih. Menyadari hal tersebut maka ketergantungan pada tehnik perbanyakan vegetatif akan semakin besar. Metode untuk perbanyakan cepat melalui kultur jaringan akan sangat bermanfaat untuk memperbanyak bahan tanam tanaman kopi.

Kultur jaringan kopi pertama kali dilakukan oleh Staritsky (1970). Kemudian dilanjutkan oleh beberapa peneliti antara lain Herman dan Haas (1975), Sondahl et al. (1984) yang mempelajari embriogenesis somatik kopi arabika. Metode yang mereka lakukan meliputi pengkombinasian auksin dan sitokinin sebagai hormon pertumbuhan tanaman untuk menghasilkan embrio somatik melalui fase induksi kalus. Peluang terjadinya variasi somaklonal pada tanaman hasil dari metode tersebut cukup tinggi (Dublin, 1981; Evans, 1989; Mohmand dan Nabors, 1990). Embriogenesis somatik secara langsung untuk mengatasi kendala tersebut telah dihasilkan oleh Dublin (1981), Priyono (1991a), dan Priyono et al. (1991) walaupun jumlah embrio yang dihasilkan relatif terbatas dibandingkan dengan embriogenesis secara tidak langsung. Jumlah embrio somatik tersebut dapat ditingkatkan melalui proses reproduksi embrio somatik pada media yang mengandung 5 mg/l BAP (Priyono, 1991 b).

Regenerasi embrioid menjadi plantlet telah dapat dilakukan (Priyono, 1991) walaupun tingkat keberhasilannya masih relatif rendah. Keberhasilan kultur embrio dapat ditingkatkan dengan pemakaian vitamin (Pierik, 1987). Biotin dan Ca-P sering ditambahkan ke dalam media kultur *in vitro* (Gamborg, 1984), keduanya diperlukan dalam kultur embrio (Collins dan Grosser, 1984). Pada tulisan ini dilaporkan hasil penelitian reproduksi embrio somatik kopi arabika dengan menggunakan BAP dan kinetin, serta regenerasi plantlet dengan menggunakan biotin dan Ca-P.

#### BAHAN DAN METODE

Eksplan yang digunakan dalam percobaan ini yaitu embrio somatik kopi arabika USDA 230762 yang dihasilkan dari media yang mengandung 5 mg/l BAP dan 0,1 mg/l IAA. Kelompok embrioid dibawa ke dalam laminar, lalu dengan menggunakan forcep dan scalpel embrioid tersebut dipisah satu per satu, selanjutnya dikulturkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 20 ml media. Embriod yang telah lengkap dengan calon akar dan kotiledon dihitung pada umur 2 bulan setelah kultur. Embriod tersebut selanjutnya dipisah satu per satu lalu dikulturkan pada media bebas hormon. Setelah 2 bulan kultur, embrioid yang dihasilkan dipisah satu per satu dan dikulturkan dalam tabung reaksi yang berisi 20 ml media untuk perakaran.

Kondisi ruang kultur baik untuk reproduksi embrio somatik maupun untuk regenerasi plantlet dipertahankan pada suhu 26-29°C, dengan periodisitas cahaya 16 jam terang dan 8 jam gelap.

Media yang digunakan untuk reproduksi embrio somatik yaitu media 1/2 MS yang dilengkapi dengan vitamin B5, casein hidrolisat (konsentrasi sedang), Ca-P (konsentrasi tinggi), IAA (konsentrasi rendah) dan 30 g/l sukrosa. BAP

dan kinetin ditambahkan ke dalam media sesuai dengan perlakuan (Gambar 1). Sedangkan media yang digunakan untuk perakaran adalah media 1/2 B5 dengan vitamin B5 dan diperkaya dengan glutamin (konsentrasi tinggi), asparagin (konsentrasi tinggi), casein hidrolisat (konsentrasi rendah), IAA (konsentrasi sedang), BAP (konsentrasi rendah), dan 30 g/l sukrosa. Biotin dan Ca-P ditambahkan ke dalam media sesuai dengan perlakuan (Gambar 3 dan 4). Campuran media diatur pada pH 5,7 sebelum dipadatkan dengan penambahan 7 g/l agar. Media agar (20 ml) diisikan ke dalam tabung reaksi selanjutnya ditutup dengan alumunium foil, dan diautoklaf pada tekanan 21 psi selama 30 menit.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Reproduksi Embrio Somatik

Reproduksi embrio somatik dapat terjadi pada semua jenis media yang dicoba. Keberhasilan regenerasi berkisar dari 51,8 - 100%. Jenis maupun konsentrasi sitokinin ternyata mempengaruhi keberhasilan proses reproduksi. Kinetin lebih berhasil mendorong proses tersebut dibandingkan dengan BAP pada setiap level konsentrasi yang sama. Baik BAP maupun kinetin, kisaran konsentrasi 2,5 - 4 mg/l memberikan hasil lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi di luar kisaran tersebut (Gambar 1).

Seperti halnya dalam keberhasilan reproduksi, ternyata jenis dan konsentrasi sitokinin juga mempengaruhi jumlah embrioid yang dihasilkan dari proses reproduksi. Namun BAP memberikan pengaruh lebih baik dibandingkan dengan kinetin pada setiap konsentrasi yang sama. Walaupun telah terjadi penurunan jumlah embrioid yang dihasilkan pada media yang mengandung 5,5 mg/l BAP atau kinetin, namun hasil tersebut masih lebih baik dibandingkan dengan media yang mengandung 2,5 mg/l BAP ataupun kinetin. Hasil

terbaik diperoleh dari media yang mengandung 4 mg/l BAP (Gambar 2). Hasil ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya (Priyono, 1991b), bahwa penambahan 5 mg/l BAP pada media dapat mendorong terjadinya reproduksi embrio somatik dengan tingkat keberhasilan cukup tinggi. Sitokinin berperan dalam pembelahan sel dan diferensiasi tunas, sedangkan auksin berperan dalam pembelahan sel dan diferensiasi akar (Bhojwani dan Razdam, 1983). Kombinasi keduanya dalam konsentrasi yang tepat diduga mendorong proses reproduksi embrio somatik.

Proses reproduksi embrio somatik seluruhnya terjadi secara langsung tanpa melalui induksi kalus, sehingga plantlet yang dihasilkan diharapkan mempunyai mutu yang homogen. Penerapan tehnik tersebut merupakan kunci keberhasilan dari embriogenesis somatik secara langsung karena tingkat keberhasilannya cukup tinggi, jumlah embrioid yang dihasilkan cukup banyak, dan waktu yang digunakan dalam proses tersebut relatif singkat (dua bulan).

#### **Regenerasi Plantlet**

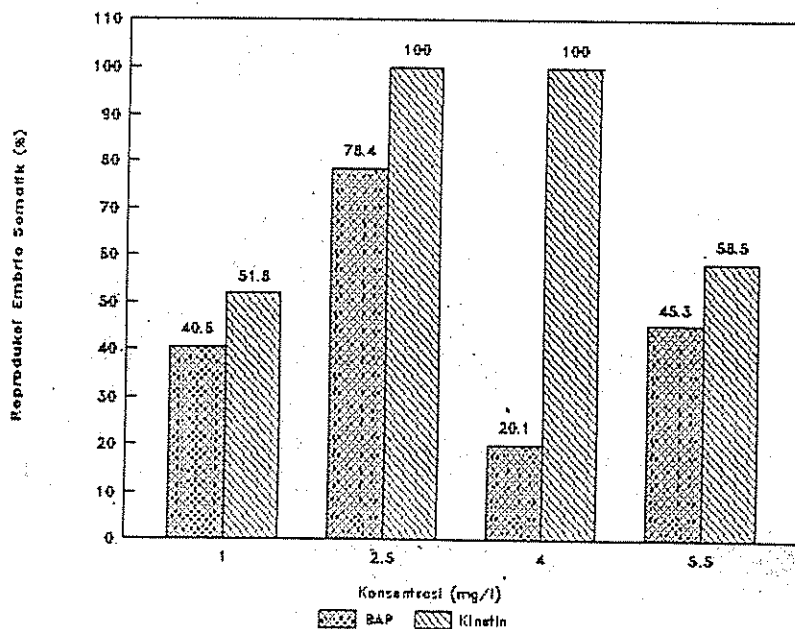
Prosentase embrio yang dapat berakar dipengaruhi oleh penambahan Ca-P dan biotin ke dalam media. Penambahan Ca-P sampai konsentrasi 10 mg/l memperbaiki tingkat keberhasilan perakaran, tetapi penambahan Ca-P sampai 20 mg/l menyebabkan hal yang sebaliknya (Gambar 3). Penambahan biotin dalam jumlah yang relatif kecil (0,05 mg/l) telah dapat meningkatkan prosentase embrio berakar. Pengaruh baik tersebut berkurang apabila konsentrasi biotin ditingkatkan menjadi 0,5 mg/l (Gambar 4). Hasil terbaik diperoleh dari media yang mengandung 10 mg/l Ca-P dan 0,05 mg/l biotin. Pada media tersebut prosentase embrio berakar dapat mencapai 83,3%.

Penambahan Ca-P dan biotin ke dalam media kultur juga mempengaruhi jumlah akar yang dihasilkan oleh plantlet.

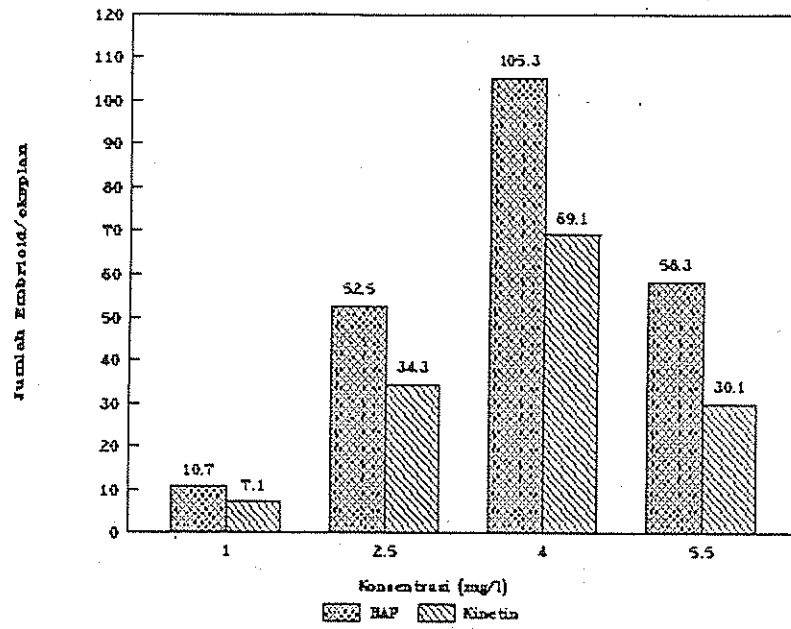
Pengaruh Ca-P dan biotin terhadap jumlah akar/plantlet mempunyai pola yang serupa dengan prosentase embrio berakar (Gambar 5). Penambahan 0,5 mg/l biotin menghambat pembentukan akar. Hasil terbaik dicapai pada media yang diperkaya dengan 10 mg/l Ca-P dan 0,05 mg/l biotin. Pada media tersebut rata-rata setiap plantlet dapat menghasilkan 18,3 akar.

Biotin dan Ca-P diperlukan dalam kultur embrio (Collins dan Grosser, 1984), karena Ca-P sangat berperan dalam reaksi enzimatik (Lehninger, 1976) sehingga dapat memperbaiki pertumbuhan sel dalam kultur *in vitro* (Bhojwani dan Razdam, 1983). Biotin selain berfungsi dalam transfer enzimatik dan pengikatan CO<sub>2</sub> (Lehninger, 1976) juga berperan dalam pembentukan klorofil (Pierik, 1987).

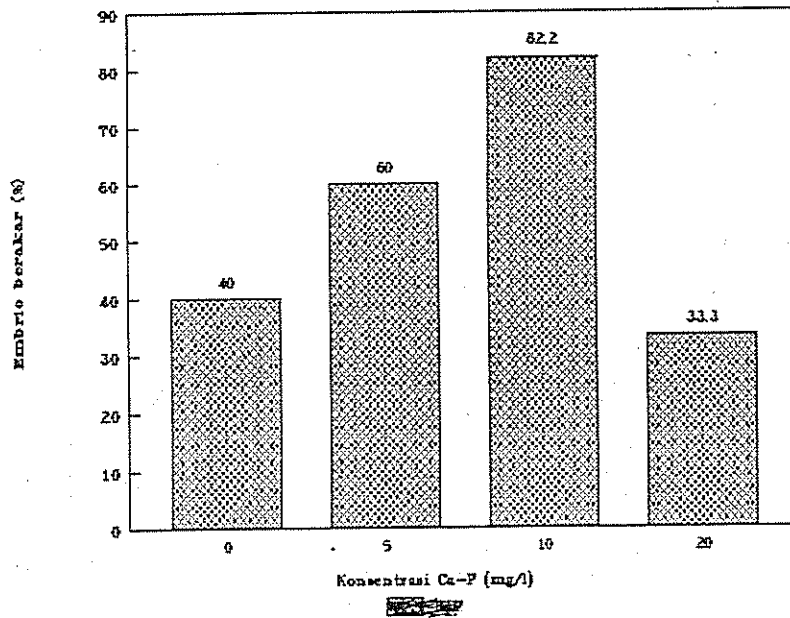
Sebagian plantlet telah dapat ditumbuhkan ke media tanah. Kendala yang dihadapi pada tahap tersebut yaitu adanya gejala vitrifikasi, ialah gejala layu secara mendadak pada plantlet yang baru adaptasi dengan lingkungan baru.



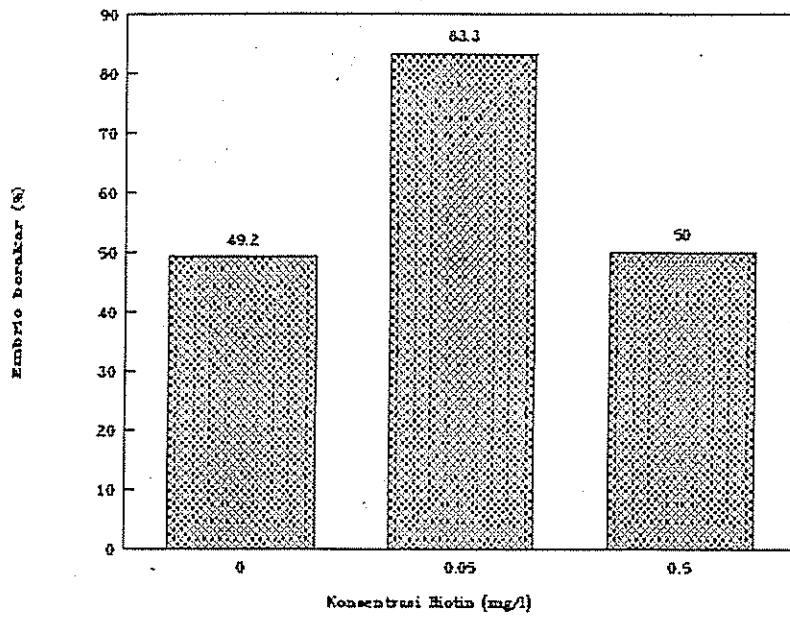
Gambar 1. Pengaruh jenis dan konsentrasi sitokinin pada keberhasilan reproduksi embrio somatik



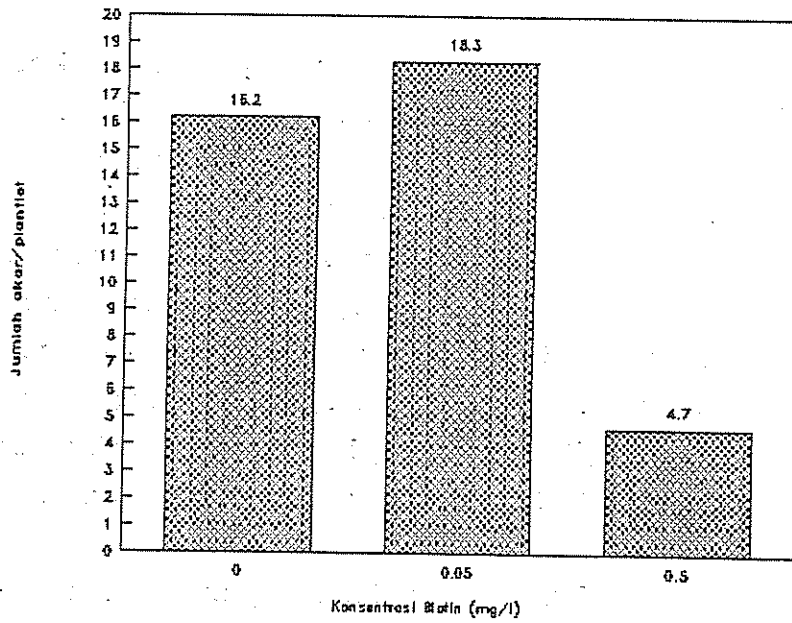
Gambar 2. Pengaruh jenis dan konsentrasi sitokinin pada produ embrioid secara langsung



Gambar 3. Pengaruh Ca-P pada prosentase embrio berakar. Media kultur mengandung 0,05 mg/l biotin.

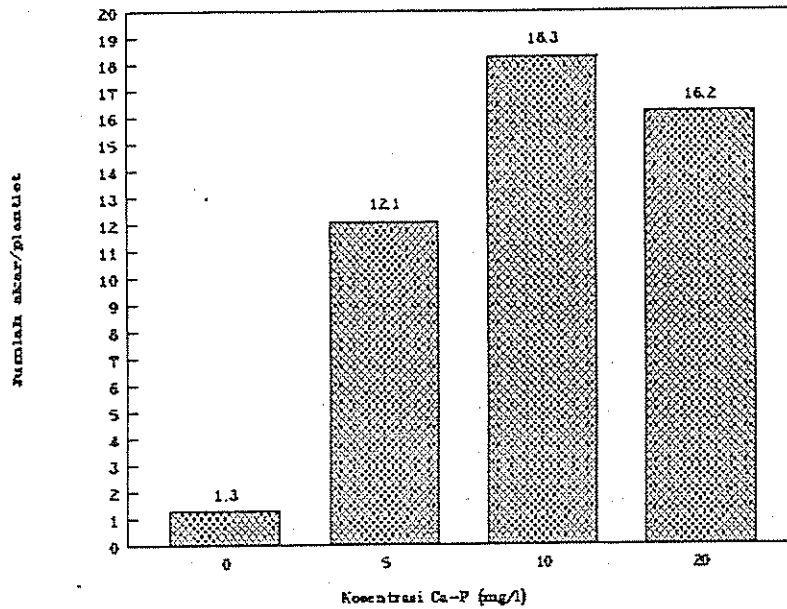


Gambar 4. Pengaruh biotin pada prosentase embrio berakar. Media kultur mengandung 10 mg/l Ca-P.



Gambar 5. Pengaruh biotin pada jumlah akar/plantlet. Media mengandung 10 mg/l Ca-P.





Gambar 6. Pengaruh Ca-P pada jumlah akar/plantlet. Media mengandung 0,05 mg/l biotin.

#### KESIMPULAN

Peningkatan jumlah embrioid yang dihasilkan dari embriogenesis somatik secara langsung dapat ditingkatkan melalui proses reproduksi embrio somatik dengan menggunakan sitokinin, baik BAP maupun kinetin.

Kinetin lebih mendorong proses reproduksi embrio somatik, sedangkan BAP lebih berperan dalam menentukan jumlah embrioid yang dihasilkan. Tingkat keberhasilan reproduksi dapat mencapai 100% pada media yang mengandung kinetin konsentrasi 2,5 dan 4 mg/l. Jumlah embrioid/eksplan dapat mencapai 105,5 pada media yang mengandung 4 mg/l BAP.

Regenerasi plantlet dipacu dengan penambahan Ca-P dan biotin. Prosentase tertinggi embrio berakar dan jumlah

terbanyak akar/plantlet diperoleh dari media yang mengandung 10 mg/l Ca-P dan 0,05 mg/l biotin. Pada media tersebut 83,3% embrio dapat berakar dengan jumlah akar/plantlet mencapai 18,3.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdam. 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practise. Elsevier, Amsterdam. 502p.
- Collins, G.B. and J.W. Grosser. 1984. Culture of Embryo. In Vasil, I.K. (ed) Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants. Academic Press, Inc., Orlando, pp.241-257.
- Dublin, P. 1981. Embryogenesis somatique derete sur fragments de feuilles de cofier arabusta. Cofe Cacao The 25(9):2. 237-242.
- Evans, D.A. 1989. Somaclonal variation basis and breeding application. Tig.5(2):46-50.
- Gamborg, O.L. 1984. Plant Cell Culture: Nutient and Media. In Vasil, I.K. (ed) Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants. Academic Press. Inc., Orlando, pp.241-257.
- Herman, E.B. and G.J. Baas. 1975. Clonal propagation of arabica coffee from callus culture. Hortscience 10:588-589.
- Lehninger, A.L. 1976. Biochemistry. Wort Publ., Inc. New York. 1104p.
- Mohmand, A.S. and M.W. Nabors. 1990. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explant of three genotypes. Plant Cell Report 8:558-560.
- Pierik, R.L.M. 1987. In Vitor Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publ., Lanscaster. 344p.
- Priyono. 1991. Organogenesis dan embriogenesis somatik pada kultur in vitro jaringan hipokotil kopi arabika. Pelita Perkebunan (Inpress).

Priyono. 1991b. Somatic embryo reproduction and regeneration derived from somatic embryo of arabica coffee. Majalah Ilmiah Instiper Yogyakarta (Inpress).

Priyono, I.Hartana, and S.Danimihardja. Micropropagation of coffee without passing callus stage. Proc. Workshop on Agric.Biotech.,Bogor, 21-24 May, 1991 (Inpress).

Sondahl,M.R., T.Nakamura, H.P.Medima-Filha, A.Carvalho, L.C.Fazuoli, W.M. Costa. 1984. Coffee. In Ammirato,P.V., D.A.Evans, W.R.Sharp, T. Yamada (eds) Handbook of Plant Cell Culture (Vol.3). Macmillan - New York. pp.564-590.