

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN TERAPAN**

**SUBTEMA KOMODITAS : KOPI (*Coffea sp.*)
TOPIK PENELITIAN : BUDIDAYA
SUBTOPIK PENELITIAN : KULTUR JARINGAN**

**PENGEMBANGAN TEKNOLOGI PROPAGASI MASSAL BAHAN
PERBANYAKAN KOPI ARABIKA (*Coffea arabica L.*)**



TIM PENGUSUL

**Dr. Ir. Irawati, M. Rur. Sc (0024116411)
Ryan Budi Setiawan SP, M.Si (1004029001)
Lily Syukriani, SP. MP. (0008098006)
Prof. Dr.sc.agr. Ir. Jamsari, MP. (0002026809)
Mela Rahmah (1510211086)
Herlin Trisnia (1510211071)**

**Dibiayai oleh Dana DIPA Universitas Andalas Tahun Anggaran 2019
Sesuai dengan Surat Perjanjian Penelitian Nomor
01/PL/SPK/PNP/FAPERTA-Unand/2019 Tanggal 3 Juni 2019**

**PRODI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
OKTOBER 2019**

HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN PENELITIAN

Judul Penelitian : Pengembangan Teknologi Propagasi Massal
Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.)

Bidang Fokus : Pemuliaan Tanaman

Ketua Peneliti

- a. Nama Lengkap : Dr. Ir. Irawati, M. Rur. Sc
- b. NIDN : 0024116411
- c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- d. Program Studi : Agroteknologi
- e. Nomor HP : 081363027898
- f. Alamat surel : irawati@agr.unand.ac.id

Anggota Peneliti (1)

- a. Nama Lengkap : Ryan Budi Setiawan, SP, M.Si
- b. NIDN : 1004029001
- c. Perguruan Tinggi : Universitas Andalas

Anggota Peneliti (2)

- a. Nama Lengkap : Lily Syukriani, SP. MP
- b. NIDN : 0008098006
- c. Perguruan Tinggi : Universitas Andalas

Anggota Peneliti (3)

- a. Nama Lengkap : Prof. Dr.sc.agr. Ir. Jamsari, MP.
- b. NIDN : 0002026809
- c. Perguruan Tinggi : Universitas Andalas

Biaya Penelitian : 20.000.000

Padang, 30 Oktober 2019

Mengetahui
Ketua Jurusan

Ketua Peneliti

Dr. Ir. Indra Dwipa, MP
NIP. 196502201989031003

Dr. Ir. Irawati, M. Rur. Sc
NIP.196411241989032002

Menyetujui
Ketua Unit Penelitian dan Pengabdian

Prof. Dr. sc. agr. Ir. Jamsari, MP
NIP. 196802021992031003

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian :

Pengembangan Teknologi Propagasi Massal Bahan Perbanyak Kopi Arabika
(*Coffea arabica* L.)

2. Tim Peneliti :

| No | Nama | Jabatan | Bidang Keahlian | Prodi | Alokasi waktu (jam/minggu) |
|----|--------------------------------------|--------------------|------------------------------------|---------------|----------------------------|
| 1 | Dr. Ir. Irawati,. M. Rur. Sc | Ketua | Fisiologi Tumbuhan | Agroteknologi | 5 jam |
| 2 | Lily Syukriani, SP. MP. | Anggota 1 | Bioteknologi dan Rekayasa Genetika | Agroteknologi | 5 jam |
| 3 | Ryan Budi Setiawan SP, M.Si | Anggota 2 | Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman | Agroteknologi | 5 jam |
| 4 | Prof. Dr.sc.agr. Ir. Jamsari, MP. | Anggota 3 (Mentor) | Bioteknologi dan Analisis Genom | Agroteknologi | 5 jam |
| 5 | Mela Rahmah | Mahasiswa 1 | Kultur Jaringan | Agroteknologi | 20 jam |
| 6 | Herlin Trisnia | Mahasiswa 2. | Kultur Jaringan | Agroteknologi | 20 jam |
| 7 | Roza Yunita | Data Kolektor 1 | Bioteknologi | Agroteknologi | 20 jam |

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian) :

Kopi Arabika, teknik propagasi massal kopi Arabica

4. Masa Penelitian :

10 Bulan

5. Dana Penelitian BOPTN disetujui Fakultas Pertanian :

Rp. 20.000.000

6. Lokasi Penelitian :

Laboratorium Bioteknologi Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas dan kebun kopi mitra Solok Rajo-Alahan Panjang.

7. Temuan yang Ditargetkan (Penjelasan gejala/kaidah, metode, teori, produk, rekayasa sosial :

Penelitian ini diharapkan mampu menghasilkan teknologi propagasi secara massal menggunakan teknologi kultur jaringan Kopi Arabica dengan komposisi genetik unggul yang seragam.

8. Kontribusi Mendasar pada Bidang Ilmu (Uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang mendukung pengembangan iptek) :

Perbanyakan klonal menggunakan teknik *in vitro* dalam rangka penyediaan bibit unggul kopi secara massal membutuhkan kemampuan teknologi terutama menyangkut faktor-faktor penentu keberhasilan regenerasi tunas dan akar untuk menghasilkan tanaman mikro yang siap digunakan sebagai bahan perbanyakan. Disisi lain, untuk meningkatkan kemanfaatan teknologi tersebut, dibutuhkan material dengan kemampuan identitas genetik unggul yang terjamin. Untuk itu, aplikasi berbasis sistem penanda molekuler merupakan pilihan yang perlu dikembangkan. Kombinasi teknologi keduanya akan memberikan kontribusi real dalam mengakselerasi penyediaan bibit kopi arabika secara massal yang saat ini sangat terbatas.

9. Jurnal Ilmiah yang Menjadi Sasaran:

Target jurnal internasional yang menjadi destinasi publikasi adalah: Journal of Biosciences Research-terindeks scopus.

10. Rencana Luaran HKI, buku, purwarupa, atau luaran tambahan lain yang ditargetkan, tahun rencana perolehan/penyelesaiannya :

Hasil penelitian ini ditargetkan akan menghasilkan output berupa teknologi propagasi massal untuk penyediaan bibit tanaman Kopi Arabika dari material dengan identitas genetik unggul yang telah dikonfirmasi statusnya.

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|---|---------|
| LEMBAR PENGESAHAN | i |
| IDENTITAS DAN URAIAN UMUM | iii |
| DAFTAR ISI | v |
| DAFTAR TABEL | vi |
| DAFTAR GAMBAR | vii |
| DAFTAR LAMPIRAN | viii |
| RINGKASAN | ix |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.3 Luaran Penelitian | 3 |
| BAB II PETA JALAN PENELITIAN DAN KAITANNYA DENGAN RIP FAKULTAS | 4 |
| BAB III TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| BAB IV METODE PENELITIAN | 11 |
| BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 17 |
| BAB VI KESIMPULAN | 27 |
| DAFTAR PUSTAKA | 28 |
| LAMPIRAN | 31 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 1. Tekstur Kalus pada Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh dan Suhu Inkubasi yang Berbeda | 21 |
| Tabel 2. Warna Kalus Kopi Arabika pada Zat Pengatur Tumbuh dan Suhu Inkubasi yang Berbeda | 22 |
| Tabel 3. Koefisien Keragaman Genetik (<i>Genetic similarity coefficient</i>) Tanaman Kopi | 25 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 1. Roadmap penelitian pengembangan kopi arabika sebagai <i>branding functional nutrition</i> | 5 |
| Gambar 2. Diagram alir pelaksanaan penelitian | 6 |
| Gambar 3. Waktu muncul kalus pada perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh dan suhu inkubasi | 18 |
| Gambar 4. Perkembangan kalus tanaman kopi arabika | 18 |
| Gambar 5. Persentase induksi kalus pada perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh dan suhu inkubasi | 20 |
| Gambar 6 Hasil amplifikasi menggunakan metode BSA pada tanaman kopi ... | 23 |
| Gambar 7. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer Em1-Me1 | 23 |
| Gambar 8. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer Em1-Me3 | 23 |
| Gambar 9. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer Em2-Me1 | 23 |
| Gambar 10. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer Em3-Me2 | 24 |
| Gambar 11. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer Em3-Me3 | 24 |
| Gambar 12. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer Em3-Me4 | 24 |
| Gambar 13. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer Em4-Me3 | 24 |
| Gambar 14. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer Em4-Me3 | 25 |
| Gambar 15. Pohon filogenetik tanaman kopi arabika | 26 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|--|---------|
| Lampiran 1. Draft Paten Isolasi DNA Kopi menggunakan Buffer Posfat | 31 |
| Lampiran 2. Draft Artikel 1 Analysis of genetic diversity of Arabica Coffee (<i>Coffea arabica</i> L.) in Solok Regency by SRAP molecular markers | 39 |
| Lampiran 3. Draft Artikel 2 Embryogenic Callus Induction Of Coffee (<i>Coffea Arabica</i> L.) On Several Plant Growth Regulator Concentration And Incubation Temperature | 45 |
| Lampiran 4. Sertifikat <i>Oral Presenter</i> dalam presentasi Analysis of genetic diversity of Arabica Coffee (<i>Coffea arabica</i> L.) in Solok Regency by SRAP molecular markers | 52 |
| Lampiran 5. Sertifikat <i>Oral Presenter</i> Dalam Presentasi Embryogenic Callus Induction Of Coffee (<i>Coffea Arabica</i> L.) On Several Plant Growth Regulator Concentration And Incubation Temperature .. | 53 |

RINGKASAN

Perbanyakan klonal menggunakan teknik *in vitro* untuk menyediakan bibit unggul kopi secara massal membutuhkan kemampuan teknologi terutama menyangkut faktor-faktor penentu keberhasilan regenerasi. Oleh karena itu studi tentang metode regenerasi secara *in vitro* pada tanaman kopi perlu dilakukan baik melalui embriogenesis somatik maupun organogenesis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh dan suhu inkubasi yang optimal untuk menginduksi kalus embriogenik tanaman kopi. Media dasar yang digunakan adalah media MS (Murasige dan Skoog) dengan penambahan 1 g/L arang aktif dan 7 g/L bacto agar. Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap faktorial. Faktor pertama adalah konsentrasi zat pengatur tumbuh yang terdiri dari 6 taraf yaitu : 0.5 mg 2.4D L⁻¹ + 1.0 mg TDZ L⁻¹, 0.5 mg 2.4D L⁻¹ + 2.0 mg TDZ L⁻¹, 1.0 mg 2.4D L⁻¹ + 1.0 mg TDZ L⁻¹, 1.0 mg 2.4D L⁻¹ + 2 mg TDZ L⁻¹, 2.0 mg 2.4D L⁻¹ + 1 mg TDZ L⁻¹, 2.0 mg 2.4D L⁻¹ + 2.0 mg TDZ L⁻¹. Faktor kedua adalah suhu inkubasi yang terdiri dari 2 taraf yaitu : 18 °C dan 26 °C. Peubah yang diamati meliputi: waktu muncul kalus, persentase induksi kalus, tekstur kalus dan warna kalus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari semua media yang diujikan hanya media dengan konsentrasi 2.0 mg 2.4D L⁻¹ + 2.0 mg TDZ L⁻¹ yang memberikan respon optimal terhadap persentase induksi kalus mencapai 100 % dengan tekstur remah dan berwarna putih agak kekuningan. Berdasarkan pengamatan juga diketahui bahwa suhu inkubasi 26 °C mampu menginduksi kalus lebih cepat dibandingkan dengan suhu inkubasi 18 °C.

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman kopi (*Coffea sp.*) merupakan spesies tanaman berbentuk pohon yang tergolong ke dalam famili *Rubiaceae* dan genus *Coffea*. Tanaman tergolong sebagai tanaman perkebunan yang dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada berbagai daerah dengan berbagai ketinggian tempat. Namun demikian, lokasi terbaik untuk pertumbuhan dataran rendah sampai menengah adalah jenis kopi robusta sedangkan pada daerah dataran tinggi umumnya lebih cocok digunakan jenis kopi arabika.

Tingkat konsumsi kopi per kapita masyarakat Indonesia lebih rendah dibandingkan dengan masyarakat Eropa yang rata-rata mengkonsumsi kopi diatas 5 kg/kapita/thn sedangkan Amerika Serikat di atas 4 kg/kapita/thn. Seiring dengan perkembangan teknologi dan industri serta tingginya kebutuhan akan konsumsi kopi global yang trendnya semakin meningkat, maka produksi kopi secara nasional perlu mendapatkan dorongan dalam peningkatan produksi (Dirjen Perkebunan, 2014).

Ekspor kopi Indonesia pada tahun 2013 tercatat sebanyak 448,6 ribu ton dengan nilai US\$ 1.249,5 juta. Angka tersebut menempatkan Indonesia menjadi eksportir ketiga terbesar setelah Brasil dan Vietnam (Aryani 2013; Wijayadi, 2013). Kopi mempunyai 103 species, akan tetapi yang banyak dibudidayakan hanya dua yaitu; kopi Arabika (*Coffea arabica*) dan kopi Robusta (*Coffea canephora*) (Priyono, 2013). Kopi Arabika memiliki kualitas cita rasa yang lebih baik dibandingkan kopi Robusta, sehingga dalam dunia perdagangan harganya relatif lebih tinggi. Bertolak belakang dengan kebutuhan dunia, ekspor kopi Indonesia justru didominasi oleh kopi Robusta (80-90%) dan hanya sebagian kecil kopi Arabika (10-20 %) (AEKI 2015).

Rendahnya produktivitas kopi Indonesia salah satunya disebabkan karena 95% kopi Indonesia merupakan perkebunan rakyat. Produktivitas kopi rakyat tersebut masih rendah yakni hanya 50-60% dari potensi produksi yang seharusnya. Salah satu penyebabnya, adalah karena umumnya petani belum menggunakan bibit kopi unggul. Disamping itu teknik budidaya yang diaplikasikan juga masih sederhana sehingga perawatan tidak intensif, lambatnya peremajaan tanaman, serta minimnya sarana dan prasarana pendukung. Kondisi tersebut mengakibatkan rendahnya mutu kopi Indonesia (Dirjen Perkebunan, 2014).

Permintaan kopi yang terus meningkat harus diimbangi, tidak ada jalan lain yang harus dilakukan selain melalui peningkatan produksi. Untuk mencapai hal tersebut, maka ketersediaan bibit berkualitas menjadi kebutuhan yang paling utama. Perbanyak kopi umumnya dilakukan dengan cara generatif yakni melalui biji. Salah satu kelemahan metode tersebut adalah tidak seragamnya morfologi anakan yang diperoleh disamping juga memiliki perbedaan yang cukup jauh dengan induknya. Selain itu, jumlah bahan tanam yang dihasilkan juga menjadi terbatas, karena biji kopi yang dihasilkan akan lebih diutamakan untuk produksi biji yang akan diolah.

Sebenarnya perbanyak kopi juga dapat dilakukan dengan cara vegetatif melalui stek, okulasi, dan sambung pucuk. Namun, cara tersebut memiliki beberapa kelemahan antara lain perbanyak hasil stek yang butuh waktu lama untuk diproduksi serta membutuhkan ketersediaan lahan yang memadai untuk menyimpan bibit stek. Kendala ini menyebabkan produksi bibit kopi untuk skala besar menjadi terbatas. Kultur jaringan merupakan teknik perbanyak tanaman yang dapat digunakan untuk memproduksi bahan tanam dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang relatif singkat. Selain itu kultur jaringan juga sangat diperlukan dalam program pemuliaan tanaman untuk mendapatkan bibit unggul, bebas hama penyakit, dan produktivitas yang tinggi (Zulkarnain, 2009).

Pengembangbiakan dalam kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Perbanyak kopi melalui embriogenesis somatik dari berbagai jenis sumber eksplan telah dilakukan dengan menggunakan kultur anther, akar, biji, daun, epikotil, hipokotil, dan kultur meristem. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penggunaan eksplan daun kopi paling responsif dalam menghasilkan embrio somatik dibandingkan bagian tanaman yang lain (Oktavia *et al.*, 2003).

Usaha perbanyak tanaman kopi melalui kultur jaringan telah lama dilakukan tetapi sayangnya belum memberikan hasil yang memuaskan. Salah satu kendala yang dihadapi sampai saat ini adalah kemampuan regenerasi spesies kopi yang rendah ditambah jika menggunakan teknik embriogenesis somatik hasil yang diperoleh sangat bervariasi dan tergantung pada media, spesies yang dikulturkan dan hormon pertumbuhan tanaman yang digunakan (Priyono, 2010).

Embriogenesis somatik sebenarnya merupakan teknik perbanyak yang lebih sesuai untuk kopi karena memungkinkan perbanyak klonal skala besar dengan biaya produksi yang relatif lebih rendah (Kumar *et al.* 2006). Perbanyak kopi Arabika melalui teknik

embriogenesis somatik menjadi bagian penting dalam menyediakan bibit dengan jumlah besar. Penguasaan teknik embriogenesis somatik juga merupakan dasar penggunaan aplikasi bioteknologi dalam peningkatan keragaman genetik. Penggunaan embriogenesis somatik dalam proses mutasi, seleksi *in vitro* dan rekayasa genetika lebih menguntungkan mengingat kopi merupakan tanaman tahunan yang memiliki masa juvenil yang panjang.

Tidak kalah pentingnya, ketika aplikasi teknik kultur jaringan digunakan, maka identitas dan keseragaman genetik bermutu menjadi sangat penting. Upaya untuk mendapatkan kondisi tersebut, dapat dilakukan melalui aplikasi teknik sistem penanda (marker) berbasis molekuler. Teknik ini terbukti mampu mengakses identitas genetik lebih akurat, karena tidak dipengaruhi oleh pengaruh lingkungan. Berbagai macam teknik sistem penanda berbasis molekuler telah banyak yang dikembangkan, seperti: RAPD, RFLP, AFLP, STS, SCARs, CAPS, SRAP, dan teknik SNP serta berbagai macam teknik molekuler lainnya.

Berdasarkan uraian diatas maka pengembangan teknologi propagasi massal tanaman kopi arabika dengan identitas dan keseragaman genetik yang terjadi menjadi suatu urgensi yang harus ditemukan. Topik penelitian tentang tanaman kopi sebagaimana diuraikan di atas sangat sesuai dengan Rencana Induk Penelitian Fakultas Pertanian Universitas Andalas yang menjadikan Kopi sebagai salah satu Komoditas Unggulan dan menjadi kebutuhan krusial Mitra Institusi.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan teknologi propagasi massal kopi arabika dengan jaminan keseragaman potensi genetik.

1.3 Luaran Penelitian

1. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai media terbaik yang mampu menginduksi kalus embriogenik tanaman kopi arabika.
2. Penelitian ini ditargetkan akan disampaikan pada Seminar Internasional pada tahun 2020 atau diterbitkan pada Jurnal Nasional terakreditasi pada tahun 2020.

BAB II PETA JALAN PENELITIAN DAN KAITANNYA DENGAN RIP FAKULTAS

Studi tentang perbanyakan massal via mikropropagasi tanaman kopi arabika penting untuk dilakukan dalam rangka menyediakan bahan tanam secara massal. Penelitian ini merupakan penelitian terapan yang memiliki relevansi dengan roadmap dan renstra Fakultas Pertanian, terutama fokus dalam teknologi perbanyakan dan penyediaan bibit tanaman kopi. Korelasi antara peta jalan Renstra dan RIP Fakultas Pertanian dan Roadmap yang direncanakan dalam program penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1.

Sebagaimana ditetapkan dalam tema, sub tema, topik dan aspek penelitian Fakultas Pertanian Unand, topik yang akan diteliti dalam penelitian ini merupakan bagian dari tema penguatan ketahanan pangan, bahan baku industry, dan obat berbasis tanaman, dengan sub tema tanaman kopi. Adapun topic penelitian termasuk ke dalam topic budidaya dengan sub topik / tema bahan perbanyakan (benih, Klonal, Plantlet) dengan teknik kultur jaringan serta inventarisasi sumber daya genetik dan keseragaman kultivar.

Sub topik/tema tersebut sengaja dipilih, mengingat kebutuhan krusial dari mitra kerjasama yakni Koperasi Petani Kopi: Solok Rajo yang pada saat ini membutuhkan jumlah bahan perbanyakan dalam jumlah yang sangat besar. Kebutuhan bibit tersebut, tidak dapat dicukupi dari kegiatan pengadaan bibit yang mereka usahakan sendiri, sementara bahan perbanyakan hasil propagasi kultur jaringan yang diperoleh dari Balitkoka Jember membutuhkan investasi yang sangat mahal. Oleh karena itu dengan dasar: problem based-research, maka sub topik/tema pengembangan masal menggunakan teknik kultur jaringan dipilih sebagai strategi yang diharapkan mampu mengatasi kebutuhan mitra kerjasama tersebut.

Uraian detail secara lengkap peta jalan kegiatan riset yang akan dilakukan dan kaitannya dengan RIP Fakultas dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Roadmap penelitian pengembangan kopi arabika sebagai *branding functional nutrition*

BAB III TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Tanaman Kopi

Hampir semua tanaman perkebunan di Indonesia, termasuk kopi bukan tanaman asli Indonesia. Tanaman kopi dalam sejarah perkembangannya merupakan salah satu tanaman eksotik paling tua yang berhasil dikembangkan di Indonesia. Kopi Arabika berasal dari Benua Afrika, tepatnya dari daerah pegunungan di Ethiopia Selatan (Abessinia). Di Negara asalnya ini Kopi Arabika tumbuh di daerah hutan tropis di bawah pohon-pohon besar pada ketinggian 1500- 2000 m dpl (Yahmadi 2000).

Tanaman kopi dibawa oleh bangsa Arab dari Ethiopia ke negerinya untuk dikembangkan dan diperdagangkan. Pada abad ke tiga belas kopi telah menyebar ke daerah laut merah, Persia dan India. Tanaman ini masuk ke Indonesia pertama kali tahun 1696, dan sejarah mencatat pada tahun 1712 telah ada pelelangan kopi asal Jawa di Amsterdam. Sejak saat itu kopi asal Indonesia mulai dikenal di pasaran eropa dengan sebutan *Java coffee* (Yahmadi 2000).

Tanaman kopi (*Coffea* spp.) secara taksonomi termasuk dalam Kindom : *Plantae*, Divisio : *Spermatophita*, Sub-divisio : *Angeospermae*, Kelas : *Dicotyledonea*, Ordo : *Rubiales*, Famili : *Rubiaceae*, Genus : *Coffea*, dan Species : *Coffea* spp. Famili *Rubiaceae* mempunyai sekitar 500 jenis dengan tidak kurang dari 600 species. Genus *Coffea* merupakan salah satu genus penting dengan 103 species. Diantara sejumlah species yang ada, paling banyak diusahakan secara komersial adalah *Coffea arabica* dan *Coffea canephora* (Siswoputranto 1993; Priyono 2013).

Pertumbuhan dan produksi tanaman kopi Arabika sangat dipengaruhi oleh iklim. Selain kelembaban udara, angin, dan lama penyinaran faktor yang paling penting diperhatikan adalah curah hujan dan suhu udara. Menurut Hulupi (1999), persyaratan kondisi iklim dan tanah untuk kopi Arabika adalah sebagai berikut: tinggi tempat > 700 m dpl, suhu harian 15 – 24 °C, curah hujan rata-rata 2.000 - 4.000 mm/thn (Curah hujan optimum 2000 - 3000 mm/tahun), jumlah hari hujan kering 1-3 bulan/tahun, pH tanah 5.3 - 6.0, kandungan bahan organik minimal 2%, kedalaman tanah efektif > 100 cm, dan kemiringan tanah maksimum 40% (Siswoputranto 1993).

Kopi Arabika akan tumbuh lebih baik di dataran tinggi 1000 - 2000 m dpl. Pada lahan yang tinggi tersebut aroma kopi Arabika lebih baik dibandingkan apabila ditanam di

lahan yang lebih rendah (Prastowo, 2010). Batas elevasi tertinggi kopi Arabika dibatasi oleh ancaman frost yang sering terjadi pada ketinggian lebih dari 2000 m dpl, sedangkan batas elevasi terendah dibatasi oleh adanya serangan penyakit karat daun yang serangannya makin parah pada suhu yang lebih tinggi, yaitu di lokasi yang elevasinya lebih rendah (Pujiyanto 1998). Berbeda dengan Kopi Robusta yang merupakan tanaman menyerbuk silang, kopi Arabika termasuk ke dalam tanaman yang menyerbuk sendiri, sehingga keragaman genetik kopi Arabika tergolong sempit. Kromosom kopi Arabika tergolong allotetraploid dengan jumlah kromosom $2n=4x=44$, peka terhadap herbisida dan serangan *Hemileia vastatrix* yang menyebabkan penyakit karat daun (Waller *et al.* 2007).

3.2 Kultur Jaringan dan Embriogenesis Somatik Tanaman Kopi

Kultur jaringan merupakan istilah yang digunakan untuk budidaya tanaman secara *in vitro* terhadap bagian tanaman yang digunakan seperti daun, batang, akar, bunga, kalus, sel, protoplas, dan embrio. Bagian tanaman tersebut diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikulturkan pada media yang steril sehingga dapat berkembang menjadi tanaman yang lengkap (Sjaril, 2011). Perbanyakan melalui embriogenesis somatik dari berbagai jenis eksplan telah dilakukan dengan menggunakan kultur anther, meristem, biji, hipokotil, epikotil, akar, dan daun. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penggunaan eksplan daun kopi paling responsif dalam menghasilkan embrio somatik dibandingkan bagian tanaman yang lain (Oktavia *et al.*, 2003).

Menurut Pishesha (2005) dalam perkembangan ilmu perbanyakan tanaman, teknik kultur jaringan mempunyai dua kegunaan utama yaitu untuk perbanyakan klonal yang akan menghasilkan propagul bermutu dan perbaikan utama tanaman untuk menghasilkan kultivar baru yang lebih unggul dan lebih mantap sesuai dengan program perbaikan sifat-sifat genetik yang dikehendaki. Kultur jaringan memungkinkan regenerasi sel somatik melalui dua alternatif jalur yaitu organogenesis dan embriogenesis somatik.

Embriogenesis somatik merupakan metode perbanyakan masal yang banyak diterapkan pada berbagai macam tanaman. Menurut Corredoira *et al.* (2006), pemahaman tentang embriogenesis tanaman penting diketahui yaitu melalui pengamatan proses seluler yang mendasari diferensiasi. Hal tersebut akan bermanfaat untuk memperoleh metode yang tepat pada aplikasi perbanyakan bibit secara massal, kryopreservasi, induksi mutasi dan transformasi genetik.

Kultur jaringan memungkinkan regenerasi sel somatik melalui dua alternatif jalur yaitu organogenesis dan embriogenesis somatik. Organogenesis adalah pembentukan tunas adventif secara langsung dari eksplan yang menghasilkan struktur *unipolar*, sedangkan embriogenesis somatik adalah proses regenerasi sel somatik yang membelah dan berkembang menjadi struktur *bipolar* atau embrio. Struktur unipolar terdiri atas tunas atau akar yang terpisah jaringan pembuluhnya, sedangkan struktur bipolar terdiri atas meristem tunas dan akar yang padu (Gunawan 1992).

Menurut Davies (2004) embrio somatik dapat terbentuk melalui 2 cara yaitu embriogenesis secara langsung dan tidak langsung. Embriogenesis langsung terjadi pada saat embrio terbentuk langsung dari jaringan eksplan atau *Pre Embryonically Determined Cells* (PEDC). Embriogenesis tidak langsung terjadi melalui fase kalus atau kultur suspensi yang biasa disebut *Induced Embryonically Determined Cells* (IEDC).

Embriogenesis somatik memainkan peranan penting dalam memperbanyak klonal secara *in vitro*. Ketika dikaitkan dengan program pemuliaan konvensional, molekular dan bioteknologi, embriogenesis somatik memberikan sesuatu yang bernilai untuk meningkatkan laju perbaikan genetik tanaman. Embriogenesis somatik menjadi sebuah hal yang sangat penting dalam mempelajari dan menganalisis berbagai peristiwa biokimia dan molekuler, sehingga memiliki nilai potensial yang besar bagi ilmu biologi dan pertanian. Gray (2005) menyatakan bahwa sel/jaringan somatik pada kondisi normal akan berkembang menjadi jaringan parenkim, tetapi dapat beralih menjadi embriogenik pada kondisi khusus. Embrio mampu diinduksi dari sel somatik diduga karena dikendalikan oleh gen dan adanya kemampuan totipotensi sel untuk tumbuh menjadi tanaman lengkap. Wattimena (1992) menyebutkan bahwa kemampuan jaringan eksplan membentuk kalus dan laju pertumbuhan kalus dapat berbeda-beda pada setiap tanaman. Kemampuan jaringan membentuk kalus dan laju pertumbuhan kalus tergantung pada media, ZPT yang digunakan dan faktor lingkungan lainnya.

Menurut Purnamaningsih (2002), faktor yang mempengaruhi pembentukan embrio somatik adalah: 1) Jenis eksplan, penggunaan eksplan yang bersifat meristematik umumnya memberikan keberhasilan pembentukan embrio somatik yang lebih tinggi. Eksplan yang digunakan dapat berupa aksis embrio zigotik muda dan dewasa, kotiledon, mata tunas, epikotil maupun hipokotil. Eksplan yang digunakan dapat berbeda tergantung jenis tanaman dan tahap perkembangan dari eksplan. 2) Sumber nitrogen, embriogenesis

somatik mengalami proses perkembangan morfologi seperti yang terjadi pada embrio zigotik. Faktor yang penting dalam induksi dan perkembangan embriogenesis somatik adalah komposisi nutrisi pada media kultur. Nitrogen merupakan faktor utama dalam memacu morfogenesis secara *in vitro*. 3) Gula, gula merupakan salah satu komponen organik yang harus diberikan ke dalam media tumbuh. Gula berfungsi disamping sebagai sumber karbon, juga berguna untuk mempertahankan tekanan osmotik media. 4) ZPT.

Embriogenesis yang dihasilkan memiliki sifat klonal yang sama seperti induknya juga mempunyai sifat juvenil seperti embrio yang berasal dari biji. Perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik terdiri dari beberapa tahap yaitu tahap inisiasi kalus embriogenik, perbanyakan kalus embriogenik, pendewasaan, penuaan, dan perkecambahan embrio somatik (Yelnitis, 2012).

Kesuksesan teknik embriogenesis somatik dalam perbanyakan tanaman kopi Arabika tidak hanya dipengaruhi oleh jumlah planlet yang dihasilkan tetapi juga dipengaruhi oleh proses aklimatisasi, dan lingkungan. Pada saat aklimatisasi, tunas yang memiliki akar hasil perbanyakan embriogenesis somatik lebih adaptif dibandingkan tunas yang tidak memiliki akar (Rostiana dan Sewita, 2007).

Pembentukan somatik embriogenesis langsung pada kopi Arabika menggunakan eksplan daun berdasarkan hasil pengujian Oktavia *et al.* (2003) pada kopi Arabika BP 426 A menggunakan 4 jenis eksplan (daun, epikotil, hipokotil, akar) menunjukkan bahwa eksplan daun menghasilkan embrio somatik lebih banyak dibandingkan eksplan lainnya. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Priyono *et al.* (2010) menggunakan daun sebagai eksplan induksi kalus. Hasil penelitian pada kopi Arabika klon AS 2K menunjukkan bahwa daun dapat diinduksi membentuk kalus pada beberapa kombinasi medium kecuali pada kombinasi medium yang mengandung $5\mu\text{M}$ 2,4-D dan $20\mu\text{M}$ 2-ip. Pada kopi Arabika varietas S 795, Sigararutang dan AS 1 menunjukkan bahwa daun dapat diinduksi pada semua kombinasi medium.

Teknik kultur jaringan memberikan alternatif dalam perbanyakan bibit kopi. Teknik ini memungkinkan untuk memproduksi bibit yang relatif seragam dalam skala besar, dengan waktu yang lebih singkat, dan bebas hama penyakit. Berbagai pendekatan yang telah dipertimbangkan untuk perbanyakan kultur jaringan kopi, diantaranya; organogenesis (menggunakan tunas adventif dan aksilar), *microcutting*, dan embriogenesis somatik (Santana-Buzzy *et al.* 2007; Andrés *et al.* 2008).

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penggunaan eksplan daun kopi paling responsif dalam menghasilkan embrio somatik dibandingkan bagian tanaman yang lain (Oktavia *et al.* 2003). Penggunaan eksplan daun pada kopi Arabika dalam embriogenesis somatik telah banyak dilakukan, diantaranya oleh Quiroz-Figueroa *et al.* (2002), Priyono (2004), dan Albarra'n *et al.* (2005). Penelitian perbanyakan tanaman kopi melalui embriogenesis somatik telah banyak dilaporkan diantaranya dari penelitian Albarra'N *et al.* (2005), Samson *et al.* (2006), dan Arimarsetiowati (2011).

Perbanyakan melalui embriogenesis somatik yang diaplikasikan dengan bioteknologi bukan hanya dapat digunakan untuk perbanyakan, tetapi juga untuk memperbaiki karakter tanaman. Hal ini menjadikan penelitian embriogenesis somatik menjadi penting. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik. Auksin NAA dan IBA baik secara tunggal maupun dikombinasikan dengan 2,4-D juga dapat digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik. Selain auksin, beberapa jenis sitokinin yang biasa dikombinasikan dengan auksin untuk menginduksi embrio somatik diantaranya adalah BA, Kinetin, Thidiazuron dan 2-iP (Wattimena *et al.* 1992). Penelitian embriogenesis somatik kopi Arabika menggunakan kombinasi zat pengatur tumbuh 2,4D, *Benzyl Amino Purine* (BAP), dan *Naphtalene Acetic Acid* (NAA) telah dilakukan oleh Neuenschwander dan Baumann (1992). Priyono dan Danimihardja (1991) menggunakan BAP dan kinetin. Priyono (1993) menggunakan *Indole Asetic Acid* (IAA), BAP dan Adenine sulfat. Induksi terbaik embrio somatik kopi Arabika secara langsung dari kultur daun muda diperoleh pada media MS standar yang diberi 4 mg/l 2,4-D dan dikombinasikan dengan 0,1 mg/l kinetin yang dapat menginduksi seluruh eksplan dalam waktu empat minggu setelah kultur. Penggandaan embrio somatik kopi Arabika terbaik diperoleh pada perlakuan 2 mg/l 2,4-D yang dikombinasikan dengan 0,1 mg/l kinetin yang dapat menghasilkan embrio somatik terbanyak dalam waktu enam minggu setelah subkultur (Riyadi dan Tirtoboma, 2004). Penelitian menggunakan 2,4-D dan BAP tanpa penambahan ZPT lainnya pada kultur kopi Arabika belum pernah dilaporkan.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini menggunakan metode percobaan yang dilaksanakan pada bulan Juni - Desember 2019, di Laboratorium Bioteknologi dan Kultur Jaringan Fakultas Pertanian, Universitas Andalas.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada percobaan ini seperti: *laminar air flow cabinet* (LAFC), lemari pendingin, *hot plate*, *magnetic stirrer*, timbangan analitik, pipet pasteur, pipet tetes, oven, erlenmeyer berbagai ukuran, gelas piala, pengaduk gelas, botol kultur, rak kultur, tabung reaksi, gelas ukur, petridish, spatula, gunting, *scalpel*, pinset, autoklaf, bunsen, korek api, handsprayer, spons, ember/baskom, kertas pH meter, kamera dan alat tulis.

Sedangkan bahan yang digunakan adalah daun kopi arabika, media MS (Murashige dan Skoog). Zat kimia penyusun dapat dilihat pada (Lampiran 2), sukrosa, vitamin, myo inositol, zat pengatur tumbuh 2,4-D, TDZ, kinetin, bacto agar, bakterisida (agrept), fungisida (dithane), HCl 0,1 N, PVP, KOH 0,1 N, alkohol 70%, alkohol 96%, larutan tween 20, aquadest steril, bayclean, plastik bening tahan panas, plastik wrap, plastik hitam, selotip, kertas label, aluminium foil, tisu, karet, spiritus, detergen dan kertas HVS.

4.3 Metode Penelitian

1. Induksi Kalus

Medium dasar yang digunakan untuk induksi kalus adalah 1/2 konsentrasi garam makro dan mikro MS (*Murashige and Skoog*) yang dilengkapi dengan vitamin B5, sukrosa 30 g L⁻¹, dan 250 mg L⁻¹ *Poliviynil polipiryrolidon* (PVP). Sebagai bahan pematat ditambahkan bacto agar 8 g L⁻¹. Penelitian disusun berdasarkan rancangan acak lengkap. Perlakuan yang diuji yaitu; 0.5 mg 2.4D L⁻¹ + 1 mg TDZ L⁻¹ ; 0.5 mg 2.4D L⁻¹ + 2 mg TDZ L⁻¹ ; 1 mg 2.4D L⁻¹ + 1 mg TDZ L⁻¹ ; 1 mg 2.4D L⁻¹ + 2 mg TDZ L⁻¹ ; 2 mg 2.4D L⁻¹ + 1 mg TDZ L⁻¹ ; 2 mg 2.4D L⁻¹ + 2 mg TDZ L⁻¹. Percobaan dilakukan dengan sepuluh ulangan dan ulangan terdiri dari 5 potongan daun.

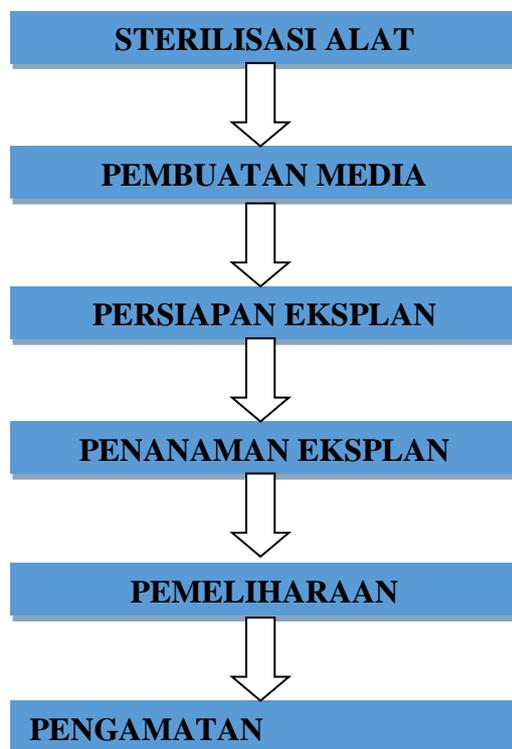
Kultur diinkubasi dalam ruang gelap pada temperatur $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban relatif $\pm 60\%$. Satu bulan dimedia induksi kalus, eksplan yang membentuk kalus dipindahkan ke media induksi kalus lanjutan yang mengandung 1/2 konsentrasi garam makro dan mikro MS, vitamin B5 (yang dimodifikasi), sukrosa 30 g L^{-1} , bacto agar 8 g L^{-1} , dan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D $4.50\text{ }\mu\text{M}$ dan BAP $17.75\text{ }\mu\text{M}$ (Etienne 2005).

2. Induksi Embrio Somatik

Kalus embriogenik yang telah terbentuk dipindahkan ke media 1/2 konsentrasi garam makro dan mikro MS, vitamin B5 (yang dimodifikasi), sukrosa 30 g L^{-1} , bacto agar 8 g L^{-1} dengan penambahan zat pengatur tumbuh kinetin $9.30\text{ }\mu\text{M}$. Kultur diinkubasi dalam ruangan gelap yang bersuhu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Perlakuan diulang sebanyak 10 kali, dimana setiap ulangan terdiri atas satu botol yang berisi kalam kalus dengan berat masing-masing $\pm 100\text{ mg}$ kalus. Peubah yang diukur adalah persen kalus yang membentuk embrio somatik.

4.4 Pelaksanaan Penelitian

Rincian pelaksanaan penelitian dapat dilihat dari gambar 2.



Gambar 2. Diagram Alir Pelaksanaan Penelitian

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat seperti petridish, scalpel, botol kultur, pinset, dan peralatan lainnya dicuci dengan detergen dan dibilas hingga bersih, selanjutnya botol direndam dalam bayclean 20% selama 24 jam, lalu dicuci lagi dan dibilas hingga bersih dan ditiriskan, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 15 Psi (pound per square inch = tekanan pada bidang seluas 1 inci) dengan suhu 121⁰C selama 15 menit.

Alat-alat selain botol kultur dibungkus dengan kertas HVS kemudian dimasukkan ke dalam plastik bening dan disterilkan menggunakan autoklaf. Air pada autoklaf diganti setiap kali pemakaian. Alat-alat yang digunakan setelah sterilisasi disimpan dalam oven hingga digunakan. LAFC disterilkan menggunakan sinar UV selama 1 jam sebelum penanaman dan disemprot dengan alkohol 70% setiap kali akan digunakan dan setelah selesai digunakan.

b. Pembuatan Media

Media yang digunakan adalah media MS. Pembuatan media MS dengan volume 1 liter adalah dipipet larutan stok makro, mikro, vitamin, zat besi dan MgSO₄ sesuai dengan volume larutan baku masing-masing media. Kemudian ditambahkan sukrosa, myo inositol dan dimasukkan ke dalam gelas piala ukuran 1 liter sambil diaduk menggunakan magnetik stirer. Media dicukupkan volumenya mencapai 1 liter dengan menambahkan aquadest dan diukur derajat kemasaman media dengan kertas pH meter, diharapkan pH 5,8. Pengaturan pH dilakukan dengan penambahan beberapa tetes NaOH 0,1 N jika terlalu masam atau penambahan HCl 0,1 N jika terlalu basa. Selanjutnya media dasar ditambahkan bacto agar 8 g/liter sebagai bahan pematid, ZPT sesuai dengan perlakuan. Kemudian media dipanaskan menggunakan *hot plate* sampai mendidih dan dituangkan ke dalam botol kultur dengan volume 25 ml/botol. Botol kultur ditutup dengan plastik dan diikat menggunakan karet gelang dan diberi label sesuai perlakuan. Kemudian media diautoklaf dengan mempertahankan tekanan 15 Psi pada suhu 121⁰C selama 15 menit setelah itu disimpan di dalam ruang kultur.

c. Persiapan Eksplan

Daun kopi yang dijadikan sumber eksplan berasal dari bibit kopi yang berumur 3 bulan yang sehat, bebas hama dan penyakit. Daun muda yang diambil merupakan 2 daun teratas yang sudah membuka sempurna yang memiliki warna merah kehijauan dipetik dari

bibit kopi arabika yang dipelihara di rumah kaca. Daun dicuci dengan air mengalir. Kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang berisi agrest dan dithane masing-masing 2 g/L ditambah 5 tetes Tween 20 direndam selama 1 jam dan dibilas dengan aquadest steril sebanyak 2 kali.

d. Penanaman Eksplan

Kegiatan penanaman eksplan dilakukan dalam LAFC. Botol kultur, alat tanam, bunsen, dan peralatan lainnya disemprot dengan alkohol 70% sebelum dimasukkan ke dalam LAFC. Alat tanam direndam dalam alkohol 96%. Eksplan direndam dengan bayclean 15% selama 5 menit dan dibilas dengan aquadest, eksplan dipotong dengan ukuran 1 cm x 1 cm, lalu direndam selama 2 menit dengan alkohol 70% dan dibilas dengan aquadest. Kemudian eksplan ditanam dalam botol kultur yang telah berisi media dengan masing-masing perlakuan, penanaman dilakukan dengan menanam 2 potong eksplan daun disetiap botol dengan posisi abaxial. Kemudian botol ditutup dengan menggunakan selotip dan dibalut dengan plastik wrap. Botol-botol tersebut disusun pada rak kultur sesuai dengan denah penempatan perlakuan. Lampiran 3

e. Pemeliharaan

Pemeliharaan terhadap ruang kultur dengan menjaga kebersihan dan suhu ruangan. Botol kultur yang berisi media dan eksplan disemprot dengan alkohol 70% dan disimpan, sedangkan eksplan serta kontaminasi segera dikeluarkan dari ruangan, untuk meminimalisir penularan media yang terkontaminasi kepada botol kultur lainnya.

f. Isolasi DNA

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman kopi yang berasal dari 15 pohon induk. Pohon induk ini berasal dari tiga lokasi yaitu Air dingin, subarang danau dan simpang tanjung nan IV. Pohon induk yang digunakan terdiri dari 5 varietas yaitu: Andungsari, Sigararutang, Kartika, Gayo, dan Sinar Harapan. Sampel ditimbang sebanyak 100 mg, kemudian dibungkus dengan aluminium foil. Setelah itu, sampel beserta mortar dan pestel disimpan ke dalam freezer -80°C selama 30 menit yang bertujuan untuk mempermudah proses penggerusan. Tahap selanjutnya sampel digerus menggunakan mortar dan pestel hingga halus. Selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam tube menggunakan spatula yang sudah disterilisasi menggunakan etanol 70%.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan protokol pada Kit Isolasi DNA (*GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit* dengan modifikasi. Setelah di isolasi,

hasil dari DNA genom di elektroforesis menggunakan *agarose 1%*. Hasil Visualisasi sampel yang telah dirunning kemudian di dokumentasikan menggunakan *UV transilluminator* maupun *Gel Documentation System*. Selanjutnya hasil isolasi DNA Genom juga diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm ($\lambda_{260/280}$) untuk menentukan kemurnian dan konsentrasi DNA.

g. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA kopi arabika dilakukan dengan menggunakan primer SRAP, yang terdiri dari 4 primer forward (Me1 – Me4) dan 4 primer reverse (Em1 – Em4). Kedua primer ini kemudian dikombinasikan sehingga terdapat 16 kombinasi primer. Amplifikasi DNA dimulai dengan kegiatan skrining primer SRAP yang dilakukan dengan cara menguji sampel dari masing-masing varietas kopi arabika menggunakan 16 primer SRAP. Seleksi primer dilakukan melalui pendekatan metode BSA (*Bulked Segregant Analysis*). Seleksi primer dipilih berdasarkan kemampuan amplifikasi primer menghasilkan fragmen DNA pada semua aksesori, jelas, dan polimorfisme tinggi.

Amplifikasi DNA kopi arabika menggunakan Protokol SRAP berdasarkan Li & Quiros (2001) dengan modifikasi pada komposisi/campuran untuk reaksi PCR dan waktu elongasi terakhir. Komposisi *cocktail* PCR sebanyak 50 μ l terdiri dari 2 μ l *template* DNA, primer *reverse* 1,5 μ l, primer *Forward* 1,5 μ l, *Free nuclease Water* 20 μ l dan *KOD* (Toyobo, Jepang) 25 μ l. Campuran tersebut dimasukkan dalam *Thermocycler* (BioRad) dengan program sebagai berikut: pre-denaturasi 94°C selama 5 menit, kemudian siklus pertama sebanyak 5 siklus terdiri atas fase denaturasi 94°C selama 1 menit, fase penempelan pada suhu 35°C selama 1 menit, selanjutnya diikuti oleh siklus kedua sebanyak 35 siklus terdiri atas fase denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, fase penempelan pada suhu 50°C selama 1 menit dan fase elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri fase elongasi pada suhu 72°C selama 8 menit dan 4°C sebagai *Holding temperature*.

Produk amplifikasi dicek menggunakan elektroforesis gel agarosa 0.7% yang di running pada tegangan listrik 100 volt selama 40 menit. Visualisasi hasil elektroforesis menggunakan sinar UV pada alat *Gel Documentation System*. Data diperoleh dari hasil visualisasi fragmen DNA kopi pada kombinasi primer SRAP yang berbeda. Bila terdapat fragmen diberikan skor 1 dan bila tidak terdapat fragmen diberi skor 0. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan POPGENE 3.2. and NTSYS ver 2.02.

4.5 Pengamatan

a. Waktu mulai berkalus (HST)

Pengamatan bertujuan untuk melihat hari pertama eksplan mulai membentuk kalus dari setiap kombinasi perlakuan. Kalus biasanya terbentuk dari perlukaan bagian daun. Eksplan dikatakan berkalus bila dibagian perlukaan pada daun muncul bintil-bintil atau gelembung seperti halnya kalus biasa yang terlihat dengan mata telanjang tanpa bantuan alat.

b. Persentase eksplan hidup membentuk kalus (%)

Pengamatan ini bertujuan untuk melihat kemampuan eksplan membentuk kalus. Pengamatan dilakukan dengan perhitungan rumus :

$$\% \text{ eksplan hidup} = \frac{\sum \text{eksplan hidup membentuk kalus}}{\sum \text{populasi tiap satuan percobaan}} \times 100\%$$

c. Tipe kalus

Pengamatan dilakukan secara visual dengan melihat bentuk kalus dari luar botol. Tipe kalus yang diamati berupa kompak atau remah (*friable*), kalus bertipe kompak merupakan kalus organogenik dan kalus bertipe remah merupakan kalus embriogenik. Pengamatan didokumentasi menggunakan kamera digital dan dijelaskan secara deskriptif.

d. Warna kalus

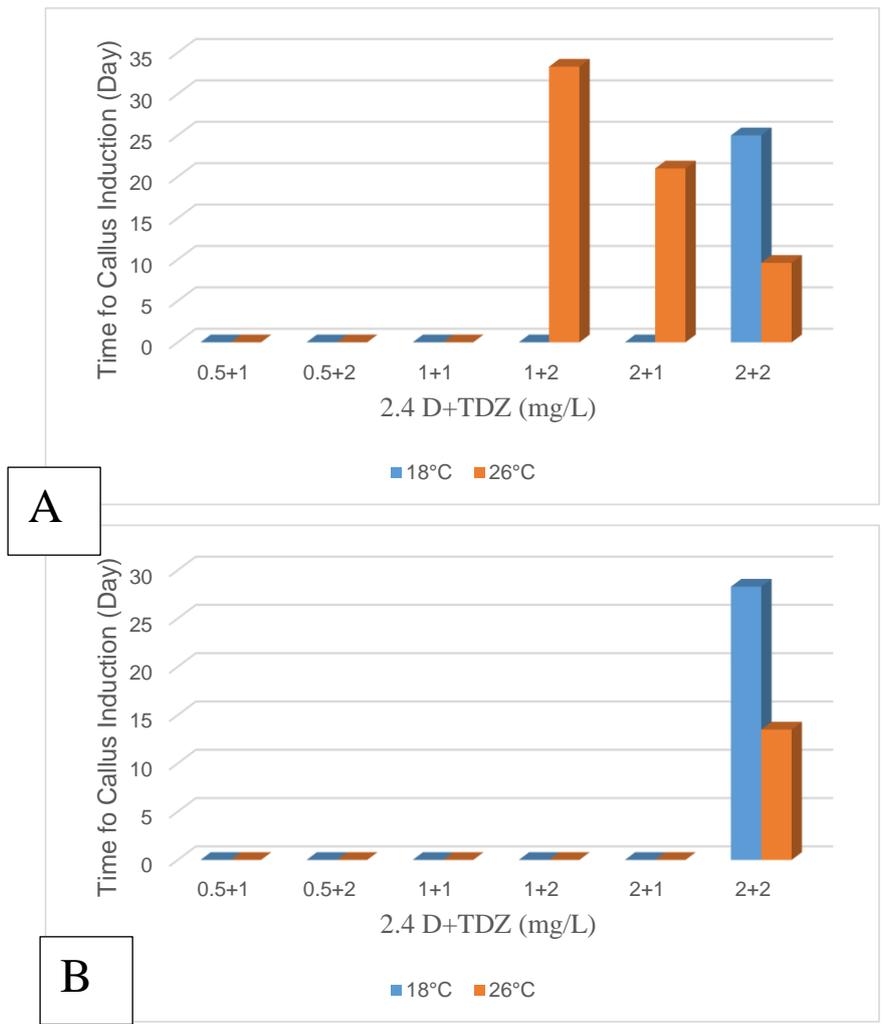
Pengamatan dilakukan setelah kalus terbentuk dengan cara mengamati perubahan warna pada kalus, baik kalus yang bewarna putih ataupun kekuningan. Hasil pengamatan didokumentasi menggunakan kamera digital dan dijelaskan secara deskriptif.

BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

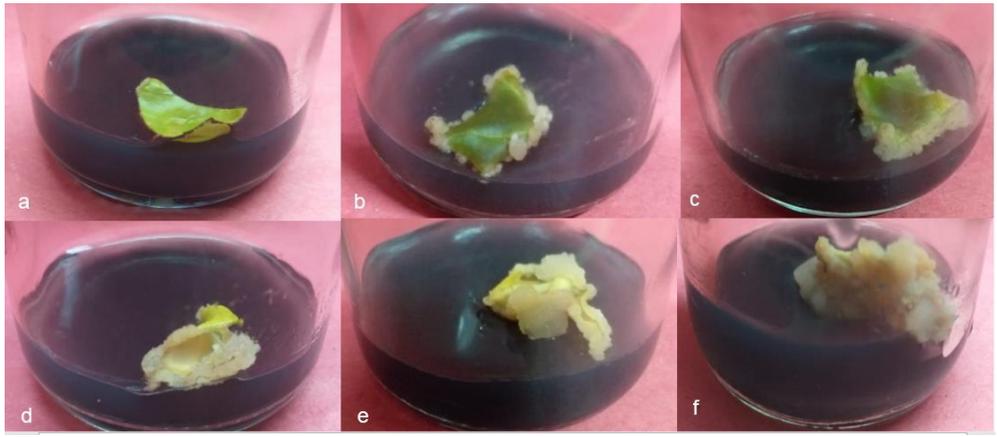
a. Muncul kalus (hari)

Munculnya kalus ditandai dengan terjadinya inisiasi dibekas potongan daun. Pembentukan kalus terlihat semakin meningkat seiring dengan bertambahnya waktu. media dengan penambahan $2 \text{ mg } 2.4\text{D L}^{-1} + 2 \text{ mg TDZ L}^{-1}$ mampu menginduksi kalus paling cepat yaitu sekitar 9 hari setelah kultur pada varietas Sigarar Utang dan 13.5 hari setelah kultur pada genotipe Sinar Harapan (Gambar 3). Zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi rendah tidak mampu menginduksi terbentuknya kalus. Satu bulan dalam media induksi, kalus yang terbentuk hanya disekitar bekas sayatan saja kemudian terus berkembang menutupi semua permukaan eksplan (Gambar 4). Hal ini juga dijumpai pada penelitian Oktavia *et al.* (2003) dimana kalus hanya terbentuk dibekas luka sayatan. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Priyono (1993) yang berhasil mendapatkan kalus dan embrio somatik pada permukaan maupun sisi daun. Perbedaan ini diduga karena ada perbedaan ukuran eksplan yang digunakan, perbedaan konsentrasi dan jenis ZPT yang ditambahkan ke media inisiasi kalus, lamanya inisiasi, serta perbedaan respon dari genotipe tanaman yang digunakan sehingga tanggap jaringan juga berbeda.

Pemberian ZPT terlihat sangat berperan dalam pembentukan kalus. Hal yang sama dilaporkan oleh Ibrahim *et al.* (2012), dimana perlakuan 2,4-D dan kinetin pada kopi Arabika mampu menghasilkan kalus. Chaudhury dan Qu (2000) menyatakan bahwa auksin dan sitokinin yang diberikan bersama-sama dapat menstimulasi terbentuknya kalus embriogenik, akan tetapi diperlukan rasio tertentu dari kombinasi keduanya untuk menginduksi pembentukan embrio somatik. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa ketika jaringan eksplan kopi Arabika ditempatkan di media nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin, sel-sel somatik melakukan proses dediferensiasi membentuk kalus dan massa pro embrio (Samson *et al.* 2006; Mene´ndez-Yuffa´ *et al.* 2010). Suhu Inkubasi juga memberikan pengaruh terhadap waktu munculnya kalus. Inkubasi pada suhu 26°C mampu mempercepat munculnya kalus pada tanaman kopi. Hal ini diduga disebabkan oleh meningkatnya laju metabolisme sel saat diinkubasi pada suhu tinggi dibandingkan dengan suhu rendah.



Gambar 3. Waktu muncul kalus pada perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh dan suhu inkubasi. A) Sigarar Utang, B) Sinar Harapan.

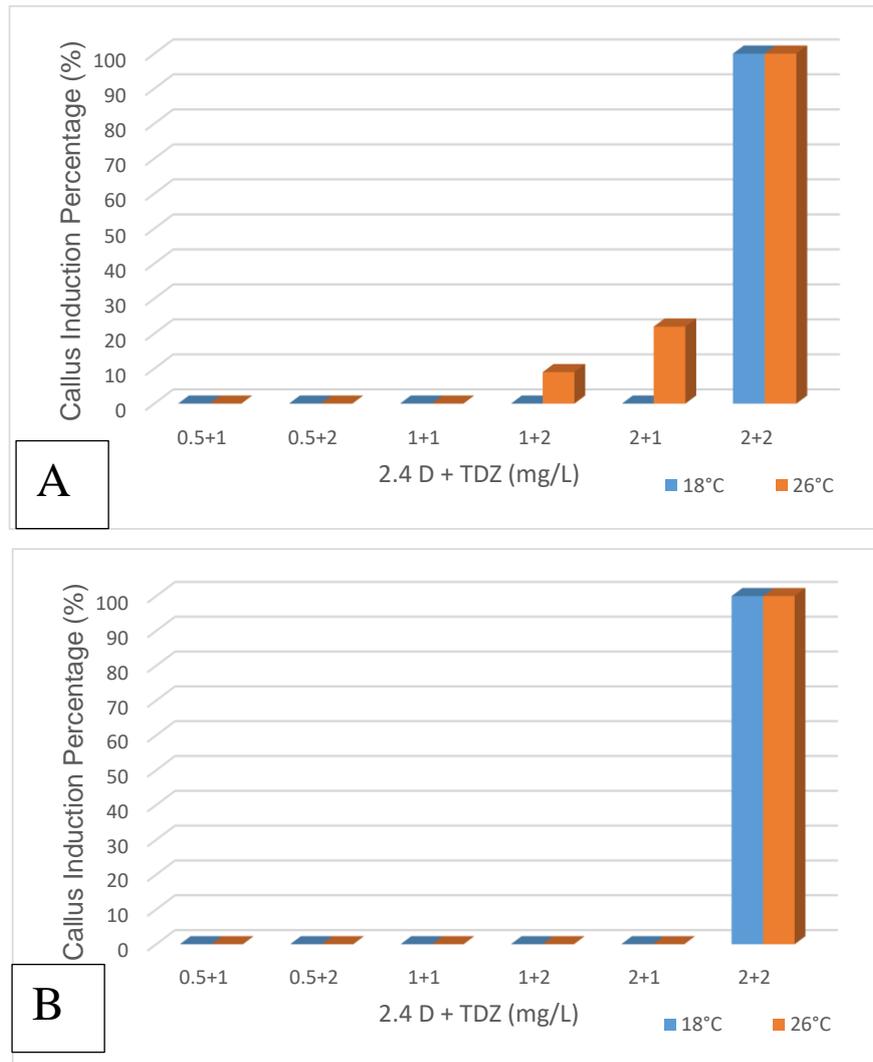


Gambar 4. Perkembangan kalus tanaman kopi arabika. a) Ekplan daun muda 1 Minggu setelah kultur (MSK), b) 3 MSK, c) 4 MSK, d) 5 MSK, e) 6 MSK, f) 7 MSK.

Persentase Induksi Kalus.

Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan terhadap persentase induksi kalus menunjukkan bahwa dari enam media yang digunakan hanya media dengan penambahan 2 ppm 2,4-D dan 2 ppm TDZ yang memberikan pengaruh terbaik dengan persentase induksi kalus mencapai 100 % pada kedua suhu inkubasi (Gambar 3). Eksplan mengalami inisiasi pada minggu ke-1 setelah penanaman. Setelah eksplan membengkak kalus mulai muncul pada permukaan eksplan seperti pada ujung eksplan dan dibekas pelukaan eksplan. Kalus merupakan sekumpulan sel yang belum terdiferensiasi dan aktif membelah sehingga membentuk masa sel yang belum terorganisir (Sjahril, 2011). Kalus yang mulai tumbuh pada eksplan terus berkembang hingga menutupi seluruh permukaan eksplan. Pada dasarnya setiap sel memiliki sifat totipotensi sel, sehingga membentuk suatu individu baru jika kondisi lingkungan hidupnya sesuai (Widianti, 2003). Dalam pembentukan kalus terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi, seperti jenis eksplan, media tumbuh, kondisi ruang inkubasi, dan zat pengatur tumbuh yang diberikan.

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan zat pengatur tumbuh 2,4-D dengan penambahan TDZ mampu menghasilkan kalus 100%. Hal ini didukung oleh Basri (2004) yang menyatakan 2,4-D merupakan auksin kuat yang berperan dalam pembelahan sel, sehingga mendukung pembentukan kalus kakao. Zat pengatur tumbuh 2,4-D lebih efektif dikombinasikan dengan sitokinin (Arianto *et al.*, 2012). Hal ini juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Riyadi dan Tirtoboma (2014) dalam menginduksi embrio somatik kopi Arabika, semua perlakuan 2,4-D yang dikombinasikan dengan kinetin mampu menghasilkan embrio somatik dalam persentase yang berbeda-beda.



Gambar 5. Persentase induksi kalus pada perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh dan suhu inkubasi. A) Sigarar Utang, B) Sinar Harapan.

b. Tekstur Kalus

Hasil pengamatan tekstur kopi secara visual menunjukkan bahwa semua perlakuan yang diujikan memiliki kalus yang bertekstur remah. Kalus yang bertekstur remah dapat diamati secara visual, kalus yang bertekstur remah terlihat seperti butiran-butiran yang mudah dipisahkan pada seluruh bagiannya. Tekstur kalus pada umumnya dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu kalus bertekstur remah dan kalus bertekstur kompak.

Kalus bertekstur remah adalah kalus yang memiliki ruang antar sel yang besar dan ikatan antar sel yang renggang, sehingga kalus mudah pecah bila dipisahkan, sedangkan kalus bertekstur kompak adalah kalus yang memiliki ikatan antar sel yang padat sehingga ruang antar sel tidak terlihat dengan jelas serta partikel-partikel kalus tidak mudah

dipisahkan. Namun pada beberapa penelitian terdapat tekstur kalus yang sedikit berbeda, yaitu kalus bertekstur remah dan kalus bertekstur kompak terdapat pada satu kalus, kalus ini disebut dengan kalus intermediate. Zulfitra (2018) telah melakukan induksi tanaman kopi dan menghasilkan kalus yang bertekstur remah dengan ciri-ciri kalus berwarna bening dan putih kekuningan yang berpotensi membentuk embrio lebih tinggi dari pada kalus yang bersifat kompak dan berwarna coklat kehitaman.

Tabel 1. Tekstur kalus tanaman kopi pada perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh dan suhu inkubasi.

| Medium | Sigarar Utang | | Sinar Harapan | |
|--|---------------|-------|---------------|-------|
| | 18°C | 26°C | 18°C | 26°C |
| 0.5 mg 2.4D L ⁻¹ + 1 mg TDZ L ⁻¹ | - | - | - | - |
| 0.5 mg 2.4D L ⁻¹ + 2 mg TDZ L ⁻¹ | - | - | - | - |
| 1 mg 2.4D L ⁻¹ + 1 mg TDZ L ⁻¹ | - | - | - | - |
| 1 mg 2.4D L ⁻¹ + 2 mg TDZ L ⁻¹ | - | Remah | - | - |
| 2 mg 2.4D L ⁻¹ + 1 mg TDZ L ⁻¹ | - | Remah | - | - |
| 2 mg 2.4D L ⁻¹ + 2 mg TDZ L ⁻¹ | Remah | Remah | Remah | Remah |

Tekstur kalus juga menentukan arah dari perkembangan kalus itu sendiri. Mahadi (2012), menyatakan bahwa kalus terdiri dari dua jenis yaitu embriogenik dan organogenik. Kalus embriogenik merupakan kalus yang memiliki tekstur yang remah dan memiliki warna putih kekuningan, kuning, dan kuning kecoklatan. Sedangkan kalus yang bertekstur kompak dan berwarna putih, kalus yang kompak menandakan bahwa kalus tersebut bersifat organogenik. Namun pada penelitian Ajizah *et al.* (2014) kalus embriogenik yang dihasilkan oleh beberapa klon kakao memiliki tekstur remah dengan warna krem kecoklatan dan kekuningan yang menggunakan zat pengatur tumbuh TDZ.

Widyawati dan Geningsih (2010) menyatakan kalus dengan tekstur remah dapat disebabkan karena adanya zat pengatur tumbuh endogen pada eksplan tersebut, penambahan 2,4-D ke dalam media akan mempercepat pembentukan kalus karena 2,4-D mampu merangsang pembelahan dan pembesaran sel, sehingga akan memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus menjadi lebih cepat. Selain 2,4-D kalus dengan tekstur remah juga dipengaruhi oleh penambahan sitokinin dalam media, kalus yang bertekstur remah mengalami pembelahan sel yang lebih cepat dibandingkan dengan kalus bertekstur kompak (Syahid *et al.*, 2010).

Kemampuan 2,4-D membentuk kalus dengan tekstur remah didukung Nisak *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa 2,4-D dapat menstimulasi pemanjangan sel dengan cara

penambahan plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel dengan cara osmosis dan sel mengalami pemanjangan, oleh karena itu kalus yang remah mengandung banyak air karena belum mengalami lignifikasi dinding sel, serta antara kumpulan sel yang satu dengan yang lain relatif mudah untuk dipisahkan.

c. Warna Kalus

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil warna kalus yang berbeda. Kalus dengan warna putih paling mendominasi pada perlakuan yang diujikan kecuali pada perlakuan 2 ppm 2.4D dan 2 ppm TDZ yang didominasi kalus berwarna putih kekuningan. Semakin tinggi konsentrasi 2,4D yang diberikan maka persentase kalus dengan warna putih semakin menurun. Warna kalus diamati dari pertama kali kalus muncul pada permukaan eksplan pada minggu ke-2 setelah tanam. Kalus yang muncul pertama berwarna putih kemudian mengalami perubahan warna pada beberapa eksplan, namun juga terdapat kalus yang tidak mengalami perubahan warna hingga akhir pengamatan. Pada akhir pengamatan kalus menghasilkan dua warna yaitu putih kekuningan dan putih.

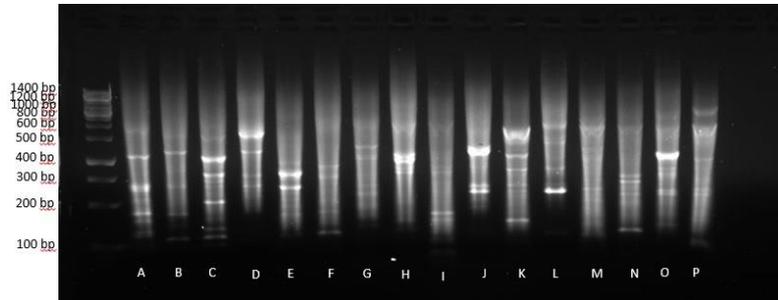
Tabel 2. Warna Kalus tanaman kopi pada perbedaan konsentrasi zat pengatur tumbuh dan suhu inkubasi.

| Medium | Sigarar Utang | | Sinar Harapan | |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 18°C | 26°C | 18°C | 26°C |
| 0.5 mg 2.4D L ⁻¹ + 1 mg TDZ L ⁻¹ | - | - | - | - |
| 0.5 mg 2.4D L ⁻¹ + 2 mg TDZ L ⁻¹ | - | - | - | - |
| 1 mg 2.4D L ⁻¹ + 1 mg TDZ L ⁻¹ | - | - | - | - |
| 1 mg 2.4D L ⁻¹ + 2 mg TDZ L ⁻¹ | - | Putih | - | - |
| 2 mg 2.4D L ⁻¹ + 1 mg TDZ L ⁻¹ | - | Putih | - | - |
| 2 mg 2.4D L ⁻¹ + 2 mg TDZ L ⁻¹ | Putih Kekuningan | Putih Kekuningan | Putih Kekuningan | Putih Kekuningan |

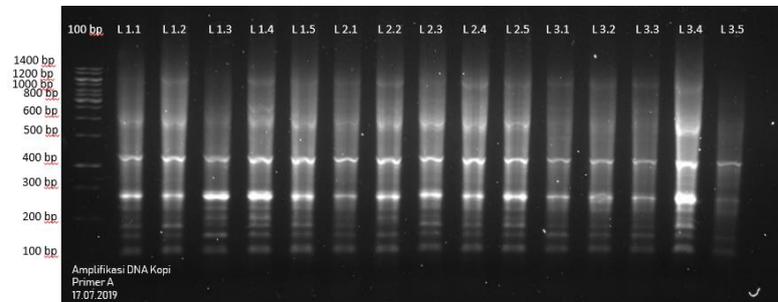
e. Seleksi primer

Seleksi primer pada kopi menggunakan pendekatan BSA (*Bulked Segregant Analysis*). Pada Gambar 6 dapat dilihat bahwa hasil seleksi 16 kombinasi primer yang dilakukan menunjukkan beberapa hasil amplifikasi ada yang terlihat jelas dan sebagian ada yang kurang jelas. Dari 16 primer ini, dipilih 8 primer terbaik berdasarkan pada kualitas pita amplifikasi dan pita polimorfisme yang dihasilkan masing-masing primer. 8

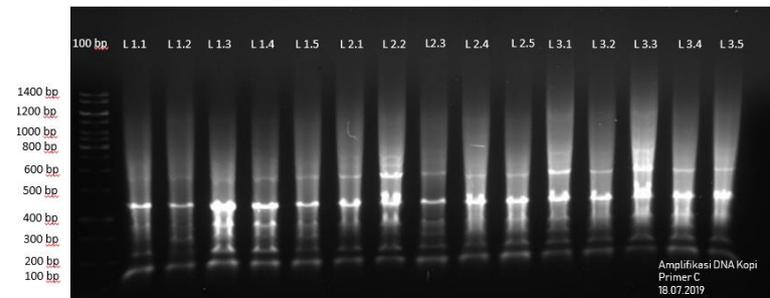
pimer tersebut adalah A,C,E,J,K,L,N,dan O dengan total fragmen pita yang dihasilkan adalah 70 fragmen. Jumlah fragmen tertinggi di hasilkan oleh primer C (11), sementara 7 primer lain hanya menghasilkan 8-10 fragmen.



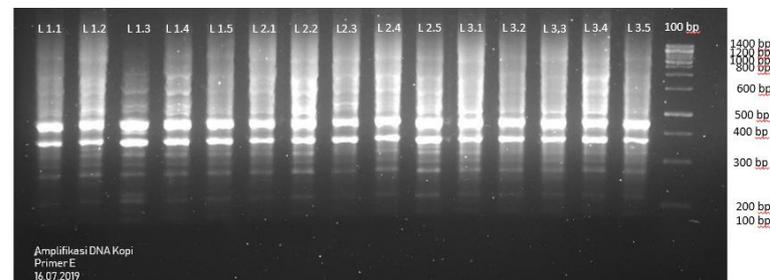
Gambar 6. Hasil amplifikasi menggunakan metode BSA pada kopi



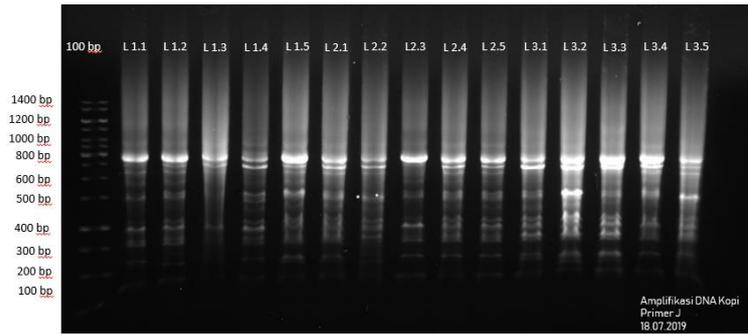
Gambar 7. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer *EM1-Me1*



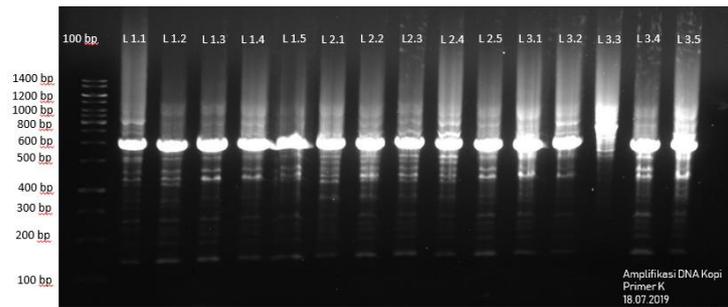
Gambar 8. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer *EM1-Me3*



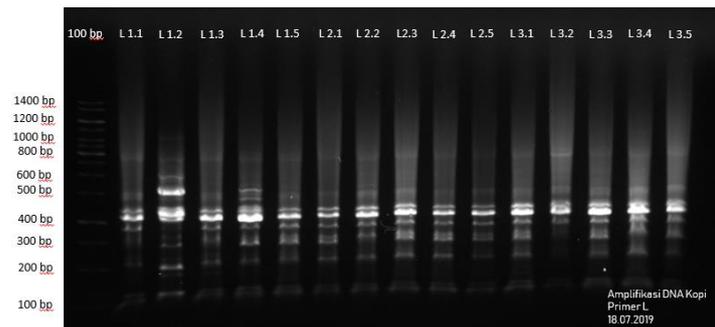
Gambar 9. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer *EM2-Me1*



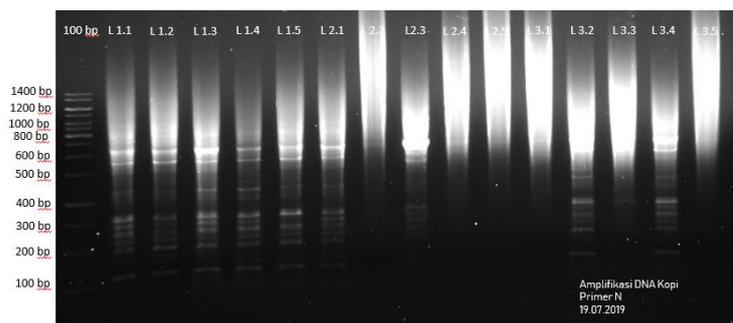
Gambar 10. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer EM3-Me2



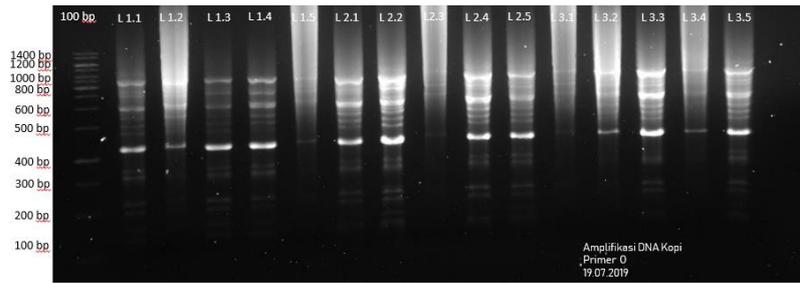
Gambar 11. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer EM3-Me3



Gambar 12. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer EM3-Me4



Gambar 13. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer EM4-Me2



Gambar 14. Hasil amplifikasi menggunakan kombinasi primer EM4-Me3

f. Keragaman Genetik Kopi Arabika

Berdasarkan tabel 3, diketahui bahwa nilai Ne terbesar ditemukan pada pohon induk L1.1 (1.6484) dan nilai Ne terkecil ditemukan pada pohon L3.2 (1.4574). Variasi genetik dilihat dari nilai H diantara pohon induk. Nilai H untuk 15 pohon induk kopi berkisar antara 0.2812-0.3638. Nilai keragaman genetik terbesar dimiliki oleh pohon induk L1.3 (0.3638) sedangkan nilai keragaman genetik terkecil dimiliki oleh pohon induk L3.2 (0.2812). PPL dari diantara makan pohon induk berkisar antara 82.61% sampai 100%.

Tabel 3. Koefisien keragaman genetik (*Genetic similarity coefficient*) Tanaman Kopi

| Populasi | na | ne | H | I | NPL | PLP |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| L1.1 | 1.9565 | 1.6485 | 0.3633 | 0.5327 | 22 | 95.65 % |
| L1.2 | 1.9130 | 1.6315 | 0.3529 | 0.5161 | 21 | 91.30 % |
| L1.3 | 1.9565 | 1.6425 | 0.3638 | 0.5346 | 22 | 95.65 % |
| L1.4 | 1.9130 | 1.6189 | 0.3499 | 0.5137 | 21 | 91.30 % |
| L1.5 | 1.9565 | 1.5517 | 0.3265 | 0.4917 | 22 | 95.65 % |
| L2.1 | 1.9130 | 1.6311 | 0.3552 | 0.5203 | 21 | 91.30 % |
| L2.2 | 2.0000 | 1.5774 | 0.3420 | 0.5152 | 23 | 100.00 % |
| L2.3 | 2.0000 | 1.5440 | 0.3266 | 0.4965 | 23 | 100.00 % |
| L2.4 | 2.0000 | 1.6159 | 0.3582 | 0.5342 | 23 | 100.00 % |
| L2.5 | 2.0000 | 1.5606 | 0.3334 | 0.5048 | 23 | 100.00 % |
| L3.1 | 1.9565 | 1.4822 | 0.2966 | 0.4559 | 22 | 95.65 % |
| L3.2 | 1.9130 | 1.4574 | 0.2812 | 0.4330 | 21 | 91.30 % |
| L3.3 | 1.8261 | 1.5454 | 0.3088 | 0.4549 | 19 | 82.61 % |
| L3.4 | 2.0000 | 1.6051 | 0.3465 | 0.5177 | 23 | 100.00 % |
| L3.5 | 2.0000 | 1.5619 | 0.3375 | 0.5105 | 23 | 100.00 % |
| Rata-rata | 1.9536 | 1.5783 | 0.3362 | 0.5021 | 21.933 | 95% |

* L1 = Air Dingin

* L2 = Subarang Danau

* L3 = Simpang Tanjung Nan IV

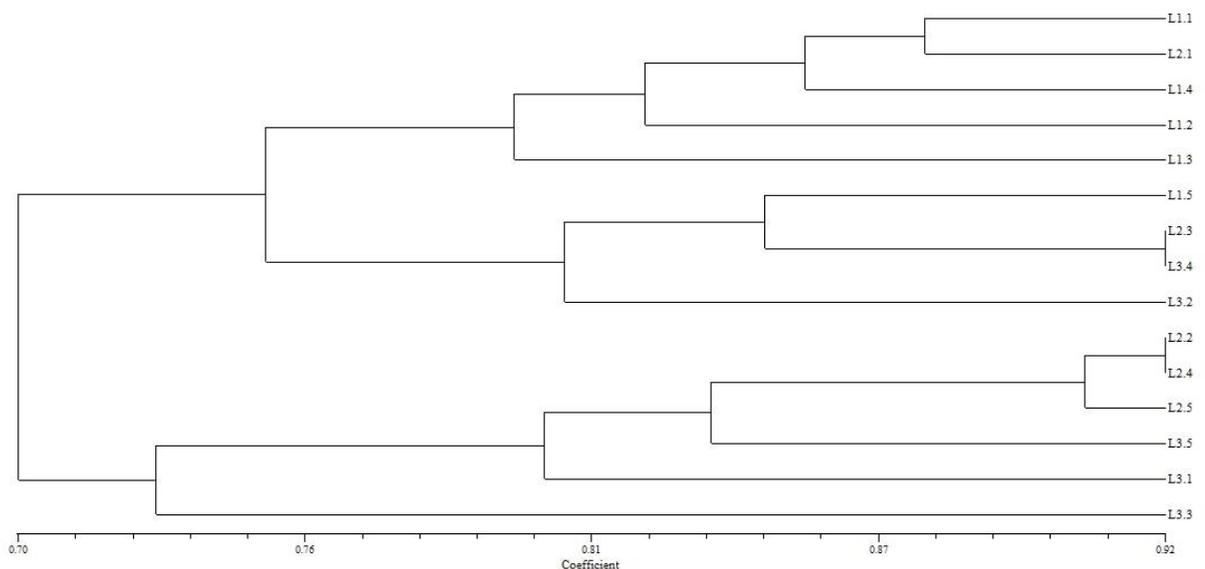
* na = Observed number of alleles

* ne = Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]

* h = Nei's (1973) gene diversity

* I = Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

Kemampuan delapan kombinasi primer SRAP menghasilkan tingkat polimorfisme yang tinggi dengan kisaran 82.61% sampai 100%, membuktikan bahwa SRAP sangat efektif digunakan untuk mengidentifikasi keragaman genetik lima varietas kopi dari tiga lokasi budi daya yang berbeda. Penanda molekuler SRAP juga berhasil menunjukkan tingkat keragaman diantara 15 pohon induk kopi yang diambil dari tiga lokasi yang berbeda. Pada Gambar 10 dapat dilihat bahwa koefisien kemiripan antar pohon induk berkisar antara 0.725 – 0.92. Nilai kesamaan tertinggi (0.92) ditemukan antara varietas Sigararutang yang berasal lokasi Subarang Danau, kemudian varietas Sigararutang yang berasal dari lokasi Air dingin dan varietas Kartika yang berasal dari lokasi Simpang Tj. Nan IV. Nilai kesamaan terendah (0.725) ditemukan antara Andungsari berasal dari Air dingin dan Sinar harapan dari lokasi Simpang Tj. Nan IV.



Gambar 15. Pohon filogenetik tanaman kopi arabika

Berdasarkan Gambar 10 diatas, diketahui bahwa kelompok klaster I umumnya terdiri dari pohon induk yang berasal dari lokasi Air dingin yaitu Andungsari, Gayo, Sigararutang. Pada Gambar 10 juga dapat dilihat bahwa beberapa varietas kopi arabika yang ditanam dilokasi yang sama tidak mengelompok dalam satu klaster (klaster II dan III).

BAB VI KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hanya media dengan konsentrasi 2 mg 2.4D L⁻¹ + 2 mg TDZ L⁻¹ yang memberikan respons optimal terhadap persentase induksi kalus yang mencapai 100% dengan tekstur remah dan berwarna putih kekuningan. Berdasarkan pengamatan juga diketahui bahwa suhu inkubasi 26 ° C dapat menginduksi kalus lebih cepat daripada suhu inkubasi 18 °C.

Analisis kekerabatan menggunakan 6 primer SRAP menghasilkan 3 kelompok klaster. Kelompok klaster I umumnya terdiri dari pohon induk yang berasal dari lokasi Air dingin yaitu Andungsari, Gayo, Sigararutang. Beberapa varietas kopi arabika yang ditanam di lokasi yang sama terbukti tidak mengelompok dalam satu klaster yang sama (klaster II dan III) yang mengindikasikan, bahwa keragaman sesame mereka masih cukup tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- [AEKI] Asosiasi Eksportir dan Industri Kopi Indonesia. 2015. Eksport kopi Indonesia Perjenis Kopi. Asosiasi Eksportir dan Industri Kopi Indonesia. <http://www.aekiaice.org>. Diakses 6 juni 2015.
- Ajizah, N., Rubiyo, Sudarsono. 2014. Pembentukan Kalus dan Embrio Somatik Kakao Menggunakan Thidiazuron Melalui Satu Tahap Induksi Kalus. *Jurnal Littri* 20(4):179-186.
- Albarra'n J, Bertrand B, Lartaud M, Etienne H. 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water, and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 81: 27–36.
- Andrés M, Gatica-Arias AM, Arrieta-Espinoza G, Esquivel AME. 2008. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. *Pontificia Universidad Católica de Valparaíso-Chile*. 11(1): 1-9.
- Arianto, Z. Basri, M.U. Bustamil. 2013. Induksi Kalus Dua Klon Kakao (*Theobroma cacao* L.) Unggul Sulawesi Pada Berbagai Konsentrasi 2,4 Dichlorophenoxy Acetic Acid Secara In vitro. *Jurnal Agrotekbis* 1(3):211-220.
- Arimarsetiowati, R. 2011. Pengaruh Auksin 2,4-D dan Sitokinin 2-ip terhadap Pembentukan Embriogenesis Somatik Langsung pada Eksplan Daun *Coffea arabica* L. *Jurnal Pelita Perkebunan* 27 (2): 68-77.
- Aryani N. 2013. *Peningkatan Produksi, Produktivitas, dan Mutu Kopi yang Berkelanjutan*. Di dalam Rubiyo, Harni R, Wardana E, Towaha J, editor. *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Kopi, Peran Inovasi teknologi Kopi Menuju Green Economy Nasional*. Bogor. 28 Agustus 2013. Badan Penelitian dan pengembangan Pertanian. Jakarta (ID). IAARD Press. hlm 1-10.
- [BPS] Badan Pusat Statistik, 2015. *Daya saing dan Pemetaan Peremajaan Komoditi Perkebunan*. Desember. Jakarta.
- Corredoira E, Valladares S, Vieitez AM. 2006. Morphohistological analysis of the origin and development of somatic embryos from leaves of mature *Quercus robur*. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 42:525-533.
- Davies PJ, editor. 2004. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Actions*. Dordrech: Kluwer Academic Pr.
- Direktorat Jendral Perkebunan, 2014. *Statistik Perkebunan Indonesia 2013-2015*. Desember. Jakarta.
- Ekanayake, S., E.R. Jansz, B.M. Nair. 2000. Literature revuew of an under utilized legume. journal *Canavalia gladiata* L. *Plant food for human nutrition*. 55: 305-320.
- Gray DJ. 2005. Propagation from nonmeristematic tissue : Nonzygotic embryogenesis, p. 187-200. In : Trigiano RN and Gray DJ (Eds.). *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press. United States of America.
- Gunawan LW. 1992. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi IPB. Bogor. 252 hal.
- Ibrahim MSD, Sudarsono, Rubiyo, Syafaruddin. 2012. Pengaruh komposisi media terhadap pembentukan kalus menuju induksi embrio somatik kopi Arabika (*Coffea arabica*). *Buletin Riset Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri* 3 (1): 13-22.
- Kumar V, Madhava N, Ravishankar GA. 2006. Developments in coffee biotechnology-*in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 87: 49-65.

- Mene'ndez-Yuffa A, Dominique Barry-Etienne D, Bertrand B, George F, Etienne H. 2010. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102: 297–307.
- Neuenschwander B, Baumann TW. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 10: 608-612.
- Nisak, K., T. Nurhidayati, dan K.L. Purwani. 2012. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi ZPT NAA dan BAP pada Kultur Jaringan Tembakau (*Nicotiana tabacum*) var. Prancak 95. *Jurnal Sains dan Seni Pomits* 1(1):1-6.
- Oktaviana, F, Siswanto; A. Budiani dan Sudarsono. 2003. Embriogenesis Somatik Langsung dan Regenerasi Planlet Kopi Arabika (*Coffea Arabica* L.) dari berbagai Eksplan. *Jurnal Menara Perkebunan* 71(2): 44-55.
- Pishesha, P. A. 2005. Pengaruh Konsentrasi IAA, IBA, BAP dan Air Kelapa terhadap Pembentukan Akar Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Wil EtKlotzch) In Vitro. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Prastowo B, Karmawati E, Rubiyo, Siswanto, Indrawanto S, Munarso SJ. 2010 *Budidaya dan Pasca Panen Kopi*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Badan Libang Pertanian. Bogor (ID). Kementrian Pertanian. 62 hlm.
- Priyono, 2010. Evaluasi Kemampuan Embriogenesis Somatik pada Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre). *Jurnal Pelita Perkebunan* 26 (2): 77-89.
- Priyono, Danimihardja S. 1991. *Reproduksi embrio somatik kopi Arabika dengan menggunakan BAP dan Kinetin serta regenerasi planlet dengan menggunakan Ca-P dan biotin*. Dalam Prosiding Seminar Bioteknologi Perkebunan dan Lokakarya Biopolimer Untuk Industri. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor (ID). 10-11 Desember 1991.
- Priyono. 2013. The Relationships and Genetic Diversity Among Species In The Genus *Coffea*. *Review Penelitian Kopi dan Kakao*. 1 (1) : 1-11.
- Pujiyanto.1998. Persyaratan Tumbuh Tanaman Kopi Arabika. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao*. 14(2): 128-133.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin AgroBio*. 5(2):51-58.
- Quiroz-Figueroa FR, Fuentes-Cerda CFJ, Rojas-Herrera R, Loyola-Vargas VM. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*. 20:1141–1149.
- Raghuramulu Y, Sreenath HL, Ramaiah PK. 1989. Regeneration of coffee plantlets through tissue culture techniques in India. *Journal of Coffee Research*. 19: 30-38.
- Riyadi, I dan Tirtoboma, 2004. Pengaruh 2,4D terhadap Induksi Embrio Somatik Kopi Arabika. *Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia*, Buletin Plasma Nutfah. Bogor. 10 (2). 82-89.
- Riyadi, I dan Tirtoboma, 2004. Pengaruh 2,4D terhadap Induksi Embrio Somatik Kopi Arabika. *Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia*, Buletin Plasma Nutfah. Bogor. 10 (2). 1-7
- Rostiana, O. dan D. Seswita (2007). Pengaruh Indole Butyric Acid dan Naphtaleine Acetic Acid Terhadap Induksi Perakaran Tunas Piretrum (*Chrysanthemum cinerariifolium* (Trevir.)Vis.)
- Samson NP, Campa C, Le Gal L, Noirot M, Thomas G, Lokeswari TS, Kochko A.de. 2006. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic

- embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 86:37-45.
- Santana-Buzzy, N, Rojas-Herrera R, Galaz-Ávalos RM, Ku-Cauic JR, MijangosCortés J, Gutierrez-Pache LC, Canto A, Quiroz-Figueroa F, Loyala-Vatgas VM. 2007. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 43: 507-520.
- Siswoputranto PS. 1993. *Kopi Internasional dan Indonesia*. Yogyakarta (ID). Kanisius. 417 hlm.
- Sjahril, R. 2011. *Pembiakan In Vitro*. Fakultas Pertanian. Universitas Hasanudin. Makassar.
- Syahid, S. Fatimah, N.N. Kristin, dan D. Seswita. 2010. Pengaruh Komposisi Media Terhadap Pertumbuhan Kalus dan Kadar Tannin Dari Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* L.) Secara *In vitro*. *Jurnal Litri* 16 (1):3-10.
- Waller JM, Bigger M, Hillocks RA. 2007. Coffee Pest, Diseases, and Their Management. Cambridge, MA. *CAB International*. 387 hlm.
- Wattimena GA, Gunawan LW, Mattjik NA, Syamsudin E, Wiendi NMA, Ernawati A. 1992. *Bioteknologi Tanaman. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat antar Universitas Bioteknologi. IPB. 309 hlm.
- Wattimena GA. 1992. Zat Pengatur Tumbuh Tanaman. PAU IPB-LSI IPB. Bogor. 247 p.
- Widianti. 2003. *Pembiakan Tanaman Melalui Kultur Jaringan*. Jakarta: Gramedia
- Widyawati, dan Geningsih. 2010. Pengaruh Variasi Konsentrasi NAA dan BAP Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar. [Tesis]. Surakarta. Universitas Sebelas Maret.
- Wijayadi. 2013. Peningkatan daya Saing kopi Indonesia di Pasar Internasional. Di dalam Rubiyo, Harni R, Wardana E, Towaha J, editor. *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Kopi, Peran Inovasi teknologi Kopi Menuju Green Economy Nasional*. Bogor. 28 Agustus 2013. Badan Penelitian dan pengembangan Pertanian. Jakarta (ID):IAARD Press. hlm 11-18.
- Yahmadi. 2000. Sejarah Kopi Arabika di Indonesia. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia*. 16 (3):180-188.
- Yelnititis. 2012. Pembentukan Kalus Remah dari Eksplan Daun Ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq)kurz). Yogyakarta: Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan. *jurnal pemuliaan tanaman hutan*. 3 (6) : 181-194.
- Zulfitra, R. 2018. Induksi Kalus Embriogenik Kopi (*Coffea arabica* L.) secara *In vitro*. [Skripsi]. Padang. Fakultas Pertanian Universitas Andalas.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta: Bumi Aksara. hal 249.