

**INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L.
ASAL SINJAI DENGAN PENAMBAHAN HORMON 2,4-D
(Dichlorophenoxy Acetic Acid) DAN KINETIN (6-Furfuryl Amino Purine)
SECARA *IN VITRO***

WIWIK PRATIWI RUSLAN

H411 16 013



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L.
ASAL SINJAI DENGAN PENAMBAHAN HORMON 2,4-D
(Dichlorophenoxy Acetic Acid) DAN KINETIN (6-Furfuryl Amino Purine)
SECARA *IN VITRO***

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains pada Departemen Biologi

Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Hasanuddin

WIWIK PRATIWI RUSLAN

H411 16 013

DEPARTEMEN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2020

HALAMAN PENGESAHAN

**INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L.
ASAL SINJAI DENGAN PENAMBAHAN HORMON 2,4-D
(Dichlorophenoxy Acetic Acid) DAN KINETIN (6-Furfuryl Amino Purine)
SECARA *IN VITRO***

Disusun dan diajukan oleh:

**WIWIK PRATIWI RUSLAN
H411 16 013**

Disetujui oleh

Pembimbing Utama



**Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si
NIP.196702071992031001**

Pembimbing Pertama



**Dr. Eva Johannes, M.Si
NIP.196102171986012001**

KATA PENGANTAR

Puji Syukur Atas Kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L. ASAL SINJAI DENGAN PENAMBAHAN HORMON 2,4-D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) DAN KINETIN (6-Furfuryl Amino Purine) SECARA *IN VITRO*”** sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan karena menyadari segala keterbatasan yang ada. Untuk itu demi sempurnanya skripsi ini, penulis sangat membutuhkan dukungan dan sumbangsih pikiran yang berupa kritik dan saran yang bersifat membangun.

Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan doa yang tulus untuk penulis. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang dengan penuh suka cita memberikan semangat, motivasi dan bantuan selama proses pencapaian gelar sarjana. Oleh sebab itu dengan kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada keluarga terkhusus kepada kedua orang tua, ayahanda Ruslan dan ibunda Sumarni. Terima kasih untuk do'a dan dukungan yang telah diberikan oleh penulis. Terima kasih sebanyak-banyaknya karena sudah menemani dan memotivasi serta dukungan penulis untuk segera menyelesaikan skripsi ini, semoga ini bisa bermanfaat bagi

ayahanda dan ibunda. Tak lupa pula untuk saudaraku Nur Azizah Amalia yang selalu mensupport kepada penulis untuk menyelesaikan skripsinya dengan baik.

Kepada bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si selaku pembimbing utama dan ibu Dr. Eva Johannes, M.Si. selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak terima kasih atas bimbingan dan ilmunya berupa kritik dan saran yang membangun dan memotivasi yang telah diberikan selama penulis melaksanakan proposal, penelitian, hingga ke tahap penyusunan skripsi ini. Terima kasih karena telah meluangkan waktu untuk terus memberi bimbingan dan arahan demi arahan yang sangat membantu hingga selesainya skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi. Kepada bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si. selaku Wakil Dekan 3 yang banyak membantu mahasiswa dalam kegiatan organisasi kampus.
2. Ibu Dr. Nur Haedar M.Si. selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin terima kasih atas ilmu, masukan serta saran kepada penulis.
3. Ibu Dr. Nurhaedar, M.Si. dan Ibu Dr. Syahribulan, M.Si selaku penguji sidang sarjana terima kasih atas segala ilmunya.
4. Ibu Hj. Zohra Hasyim, M.Si, selaku penasehat akademik yang selalu membimbing dan memantau perkembangan akademik penulis dari awal kuliah hingga akhirnya penulis menyelesaikan skripsinya.
5. Kepada seluruh dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses

perkuliahan. Serta kepada staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.

6. Kepada UPT. Bonto-Bonto Kabupaten Gowa, terkhusus kepada Laboratorium Kultur Jaringan. Terima kasih karena telah mengizinkan penulis untuk melaksanakan proses penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan UPT Bonto-Bonto Kabupaten Gowa hingga selesai. Terima kasih sudah memberikan banyak ilmu. Terima kasih pula kepada Kepala Laboratorium Kultur Jaringan UPT. Bonto-Bonto, Ibu Darni beserta para stafnya, atas segala bimbingan, ilmu, serta masukannya yang telah diberikan kepada penulis.
7. Kepada Pak Mansyur, dan adik-adik smk yang selalu siap membantu mulai dari awal penelitian sampai berakhirnya penelitian penulis. Terima kasih telah memberikan banyak pengalaman baru selama penulis tinggal di sana selama sebulan.
8. Kepada kak Nurul Qalby, S.Si. yang telah banyak membantu dan memberi arahan penulis dalam mengerjakan penelitian baik berupa ilmu, kritik, saran yang sangat berharga bagi penulis.
9. Kepada sahabat saya, Afifah, Ayu dan yuli terima kasih sudah mensupport.
10. Kepada teman sepenelitian dan seperjuangan, Aulia Mawaddah Rahman, Hasmawati dan Syianto Tri Putra Alam Mulyoto terima kasih untuk segala bantuannya.
11. Kepada saudari Aulia Mawaddah Rahman, terima kasih sebanyak-banyaknya selalu menemani dari awal penelitian sampai akhir penyusunan skripsi.

12. Kepada Saudara Kak putri, Fahrani, imma, Fatimah dan Syianto terima kasih selalu meluangkan waktu untuk mendengarkan keluh kesah penulis.
13. Kepada sahabat seperjuangan Nurhikmah S.Si, Winda Winarti, Sri Sulastriani, S.Si, Adhythya Putri Rachmadani Yunus, Firdha Nurhikmah, Aulia Mawaddah Rahman dan Siti Hasmirawati Basir, S.Si, terima kasih karena selalu ada menemani dan mensupport penulis dalam perkuliahan, penelitian hingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini.
14. Kepada teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2016, terima kasih atas pengalaman organisasi, kebersamaan, canda tawa, dukungan, motivasi, serta bantuan yang tidak dapat penulis jabarkan satu persatu.

Dengan ini saya mengucapkan terima kasih banyak untuk semua pihak yang terlibat, semoga kedepannya skripsi ini dapat berguna sebagai referensi tambahan bagi banyak orang.

Makassar 25 Juni 2020

Penulis

ABSTRAK

Penelitian ini berjudul “Induksi Kalus Tanaman Kopi Robusta *Coffea Canephora* L. asal Sinjai Dengan Penambahan Hormon 2,4-D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) dan Kinetin (6-Furfuryl Amino Purine) Secara In Vitro. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi 2,4-D dan Kinetin dan konsentrasi yang terbaik untuk pertumbuhan kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. asal Sinjai. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Provinsi Sulawesi Selatan pada Bulan Maret-Mei 2020. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dua faktorial dengan 16 perlakuan dan 3 kali ulangan. Faktor pertama adalah berbagai konsentrasi 2,4-D (1 ppm, 2 ppm dan 3 ppm) dan Faktor kedua adalah konsentrasi Kinetin (0,5 ppm, 1 ppm dan 1,5 ppm). Analisis data dilakukan dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Hasil yang berbeda nyata dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan hormon sintetik pada perlakuan A1B2 memberikan hasil yang signifikan untuk Berat Basah Kalus.

Kata Kunci : Kalus, 2,4-D, Kinetin, *Coffea canephora* L., Kultur Jaringan

ABSTRACT

The research is titled "Callus Induction of Robusta *Coffea Canephora* L. Coffee Plant from Sinjai with the addition of Hormones 2,4-D and Kinetin tissue culture. This research aims to understand the addition effect combination giving 2,4-D and kinetin, and the best concentration for growth of Robusta *Coffea canephora* L. coffee from Sinjai. The study was conducted at the Tissue Culture Laboratory, UPT Hortikultura Seed Institute of South Sulawesi Province in the month March-May 2020. This study used a two factorial Complete Randomized Design with 16 treatments and 3 replications. The first factor is the various concentrations of 2,4-D (1 ppm, 2 ppm and 3 ppm) and the second factor is the concentration of Kinetin (0.5 ppm, 1 ppm and 1,5 ppm). Data analysis was performed using Analysis of Variance (ANOVA). Significantly different results were followed by the DMRT test at the 5% level. The results showed that the addition of synthetic hormones in the A1B2 treatment gave significant results for Wet Callus Weight.

Key Words : Callus, 2,4-D and Kinetin, *Coffea canephora* L., *In vitro*.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	4
I.3 Manfaat Penelitian	5
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 Botani Tanaman Kopi Robusta	6
II.2 Pertumbuhan Kalus Kopi Robusta	8
II.3 Peranan ZPT 2,4-D dan Kinetin Terhadap Pertumbuhan Kalus	12
II.4 Lingkungan Tumbuh Tanaman Kopi	13
II.5 Kultur Jaringan Tumbuhan	15
II.6 Media Kultur	16

BAB III METODE PENELITIAN	17
III.1 Alat dan Bahan	17
III.2 Rancangan Penelitian	17
III.3 Pelaksanaan	19
III.3.1 Sterilisasi Peralatan	19
III.3.2 Sterilisasi Ruang Kerja.....	19
III.3.3 Sterilisasi Eksplan	19
III.4 Pembuat Larutan Stok	20
III.5 Pembuatan Medium	20
III.6 Penanaman Eksplan	22
III.7 Pemeliharaan Eksplan	23
III.8 Pengamatan	23
III.9 Analisis Data	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
IV.1 Hari Munculnya Kalus Daun Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.	25
IV.2 Warna Kalus Daun Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.....	27
IV.3 Tekstur Kalus Daun Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.	31
IV.4 Berat Basah Kalus Daun Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.....	34
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	37
V.1 Kesimpulan	37
V.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan 2,4-D dan Kinetin.....	18
Tabel 2. Pembuatan Medium MS + 2,4-D + Kinetin	21
Tabel 3. Warna Kalus pada Kombinasi 2,4-D dan Kinetin pada 9 MST (Minggu Setelah Tanam).....	27
Tabel 4. Tekstur kalus pada kombinasi 2,4-D dan kinetin pada 9 minggu setelah tanam.....	31
Tabel 5. Hasil Uji Lanjut DMRT Pada Berat Basah Kalus.....	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.....	7
Gambar 2. Morfologi kalur rejasa (A) kalus yang tumbuh pada perlakuan.....	10
Gambar 3. Tekstur kalus yang terbentuk pada berbagai perlakuan.....	11
Gambar 4. Grafik Rata-rata Hari Munculnya kalus	25
Gambar 5. Warna kalus yang berumur 9 Minggu Setelah Tanam.....	29
Gambar 6. Tekstur Kalus Remah Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L. Asal Sinjai dengan Kombinasi Hormon 2,4-D dan Kinetin.....	32
Gambar 7. Grafik Rata-rata Berat Basah Kalus.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1.	Komposisi Media Murashige and Skoog (MS)	42
Lampiran 2.	Deskripsi Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.....	43
Lampiran 3.	Skema Kerja	44
Lampiran 4.	Proses Kerja Pembuatan Media.....	45
Lampiran 5.	Pembuatan Larutan Stok 2,4-D dan Kinetin.....	46
Lampiran 6.	Pembuatan Medium MS+2,4-D, Medium MS+Kinetin dan Medium MS+2,4-D+Kinetin.....	47
Lampiran 7.	Sterilisasi Eksplan.....	48
Lampiran 8.	Penanaman.....	49
Lampiran 9.	Pemeliharaan dan Pengamatan	50
Lampiran 10.	Hasil Pengamatan Kalus Tanaman Kopi Robusta <i>Coffea</i> <i>canephora</i> L Asal Sinjai dengan Penambahan Hormon 2,4- D dan Kinetin	51
Lampiran 11.	Tabel ANOVA Hari Muncul Kalus.....	56
Lampiran 12.	Tabel ANOVA dan Uji DMRT Berat Basah Kalus	57

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kopi menjadi komoditi penting dalam perdagangan internasional sejak abad ke-19. Kebutuhan kopi di dunia setiap tahunnya terus meningkat. Data International Coffee Organization (ICO) tahun 2014 menunjukkan bahwa pertumbuhan konsumsi kopi dunia periode tahun 2008-2012 sebesar 6,9%, dengan rata-rata pertumbuhan tiap tahunnya 1,7%. Berdasarkan data Asosiasi Eksportir dan Industri Kopi Indonesia (AEKI) tahun 2014, konsumsi kopi di Indonesia mengalami pertumbuhan, tercatat dalam periode tahun 2008-2012 meningkat sebesar 9,1% atau rata-rata pertumbuhan setiap tahunnya 2,3% (Santosa, dkk., 2016).

Kopi *coffea sp* merupakan tanaman perkebunan yang sudah lama dibudidayakan. Selain sebagai sumber penghasilan rakyat, kopi menjadi komoditas andalan ekspor dan sumber pendapatan devisa Negara. Meskipun demikian, komoditas kopi sering kali mengalami fluktuasi harga sebagai akibat ketidakseimbangan antara permintaan dan persediaan komoditas kopi di pasar dunia (Azmi dan Ari, 2018). Saat ini Indonesia telah menjadi negara produsen kopi terbesar ke empat di dunia setelah Brasil, Kolombia dan Vietnam. Kopi yang dihasilkan di Indonesia adalah kopi Arabika dan kopi Robusta yang tergolong mempunyai kualitas yang baik sehingga banyak diekspor ke negara-negara maju yang merupakan negara konsumen kopi, di antaranya Amerika, Jepang, Belanda, Jerman dan Italia (Kahpi, 2017).

Tanaman kopi telah dikenal oleh penduduk Sulawesi Selatan sejak abad ke 17 dari pedagang Arab yang melakukan perdagangan dengan kerajaan Gowa.

Dalam periode ini masyarakat Sulawesi Selatan mulai mengembangkan tanam kopi di gunung Lompobattang dan Toraja. Hal ini diperkirakan diprakarsai oleh Raja Gowa dan pedagang Arab, sehingga pengembangannya di Toraja berlangsung bersamaan dengan di Gowa (Gunung Lompobattang). Namun, komersialisasi komoditi kopi baru dilakukan pada tahun 1830 seiring dengan pengembangan tanaman kopi yang dilakukan oleh Pemerintah Hindia Belanda (Kahpi, 2017).

Kabupaten Sinjai merupakan salah satu daerah di Sulawesi Selatan yang memiliki potensi untuk pengembangan kopi robusta dan arabika. Kabupaten Sinjai beriklim tropis, dengan kelembapan udara 64-87%, suhu udara 21,1°C dengan ketinggian tempat antara 0-1500 mdpl yang merupakan tempat tumbuh yang ideal bagi tanaman kopi. Sejalan dengan arah pengembangan kopi robusta oleh pemerintah Kabupaten Sinjai. Kecamatan Sinjai Borong dan Sinjai Barat menjadi daerah sasaran utama yang difokuskan untuk mengembangkan kopi robusta. Kawasan ini berpotensi tinggi untuk pengembangan kopi robusta rakyat, sehingga dapat meningkatkan pendapatan petani melalui peningkatan produktivitas dan mutu.

Kopi Robusta dapat dikatakan sebagai kopi kelas dua setelah kopi Arabika, karena rasanya lebih pahit, sedikit asam, dan mengandung kafein dalam kadar yang jauh lebih tinggi daripada Arabika. Namun, cakupan daerah tumbuh kopi Robusta lebih luas daripada kopi Arabika. Keunggulan kopi jenis ini adalah lebih resisten terhadap serangan hama dan penyakit. Hal ini menjadikan harga kopi Robusta lebih murah. Kopi Robusta mempunyai peranan penting bagi mayoritas pekebun kopi Indonesia, maka diperlukan upaya peningkatan produktivitas dengan menggunakan bahan tanam yang sesuai dengan kondisi

lingkungan kebun dan teknologi budidaya yang tepat serta mempertahankan kualitas dan meningkatkan nilainya (Purwanto, dkk., 2015).

Perbanyakan tanaman kopi dapat dilakukan dengan cara vegetatif dan generatif. Perbanyakan generatif menggunakan bagian generatif tanaman kopi untuk perbanyakan, yaitu benih (biji). Sementara itu perbanyakan dengan cara vegetatif, yaitu menggunakan bagian vegetatif tanaman kopi, seperti daun, ranting, cabang, dan akar untuk perbanyakan tanaman. Cara perbanyakan vegetatif, diantaranya setek dan sambung terutama untuk kopi jenis Robusta. Perbanyakan vegetatif salah satunya adalah dengan cara setek, diharapkan dapat terjamin sifat-sifat yang sama dengan indukannya. Agar pembangunan di bidang perkebunan yang telah direncanakan pemerintah dapat segera terwujud, maka perlu adanya upaya dalam cara pelaksanaannya, sehingga pada saat tanam selalu tersedia bibit dalam jumlah cukup, tepat waktu dan berkualitas tinggi. Indikasi keberhasilan penyetekan adalah timbulnya akar dan tunas (Azmi dan Ari, 2018).

Kultur jaringan merupakan metode untuk mengisolasi bagian tanaman seperti jaringan serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik. Teknik kultur jaringan ini diharapkan mampu menghasilkan bibit berkualitas yang terbebas dari virus. Keunggulan lain dari kultur jaringan yaitu dengan memperoleh sifat fisiologi dan morfologi yang sama dengan tanaman induknya. Keberhasilan kultur jaringan tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya sterilisasi, pemilihan bahan eksplan, faktor lingkungan seperti pH, cahaya dan temperatur, serta kandungan ZPT (Zat Pengatur Tumbuh) dalam medium kultur tersebut (Pangestika, dkk., 2015).

Kultur *in vitro* telah terbukti dapat digunakan untuk menyediakan bibit tanaman secara massal dan cepat. Perbanyakan tanaman menggunakan tehnik

kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Pada kultur *in vitro* kopi, kedua jalur baik organogenesis dan embriogenesis somatik telah dilakukan untuk tujuan perbanyakan tanaman. Eksplan yang digunakan untuk jalur organogenesis adalah stek buku, tunas aksilar, dan apikal, sementara jalur embriogenesis somatik adalah daun muda. Embriogenesis somatik merupakan suatu proses dimana struktur bipolar yang menyerupai embrio zigotik berkembang dari satu sel non-zigotik tanpa adanya hubungan pembuluh dengan jaringan asalnya (Ibrahim, 2015).

Berdasarkan hal di atas dapat diketahui bahwa kopi robusta *Coffea canephora* L. semakin diminati dan harus mengalami peningkatan perbanyakan tanaman dengan tehnik kultur jaringan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang induksi kalus tanaman kopi robusta *Coffea canephora* L. asal Sinjai dengan penambahan hormon 2,4-D (Dichlorophenoxy acetic acid) dan Kinetin (6-Furfuryl Amino Purine) melalui kultur jaringan.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu :

1. Mengetahui pengaruh pemberian kombinasi 2,4-D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) dan Kinetin (6-Furfuryl Amino Purine) terhadap pertumbuhan kalus kopi robusta *Coffea canephora* L. asal Sinjai.
2. Mengetahui konsentrasi 2,4-D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) dan Kinetin (6-Furfuryl Amino Purine) yang terbaik untuk pertumbuhan kalus kopi robusta *Coffea canephora* L. asal Sinjai.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pertumbuhan kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. asal Sinjai dari beberapa kombinasi 2,4-D dan kinetin secara *In vitro* dan dapat dipergunakan sebagai bahan acuan untuk penelitian tanaman kopi Robusta.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2020. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar dan Laboratorium Kultur Jaringan UPT Bonto-Bonto Kabupaten Gowa.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Botani Tanaman Kopi Robusta

Kopi robusta merupakan varietas *coffea canephora* yang paling banyak ditanam, yang mencapai 95% populasi di seluruh dunia. Tidak seperti kopi arabika, tanaman kopi robusta tidak perlu tumbuh pada ketinggian tinggi, membutuhkan perawatan yang kurang karena lebih keras, dan cenderung kurang rentan terhadap hama yang merupakan daerah distribusi dan sesuai dengan panas dan lembab daerah iklim. Di temukan di ketinggian rendah dan menengah daerah di Afrika (Pantai Gading, Republik Demokratik Kongo), Kamerun, Uganda, Angola, Ghana, Togo, Madagaskar, Tanzania dan Republik Afrika Tengah). Di Timur Jauh (India, Indonesia, Filipina), dan di Oseania (Kaledonia Baru) (Tshilenge, dkk., 2009).

Kopi Robusta masuk ke Indonesia pada tahun 1900an. Kopi ini ternyata tahan penyakit karat daun, dan memerlukan syarat tumbuh dan pemeliharaan yang ringan, sedang produksinya jauh lebih tinggi. Oleh karena itu kopi ini cepat berkembang, dan mendesak kopi-kopi lainnya. Saat ini lebih dari 90% dari areal pertanaman kopi Indonesia terdiri atas kopi Robusta (Sembiring, dkk., 2018).

Ciri-ciri dari tanaman kopi robusta yaitu tinggi pohon mencapai 5 m, sedangkan ruas cabangnya pendek. Batangnya berkayu, keras, tegak, putih ke abu-abuan. Seduhan kopi robusta memiliki rasa seperti cokelat dan aroma yang khas, warna bervariasi sesuai dengan cara pengolahan. Kopi bubuk robusta memiliki tekstur lebih kasar dari kopi arabika. Kadar kafein biji mentah kopi

robusta lebih tinggi dibandingkan biji mentah kopi arabika, kandungan kafein kopi robusta sekitar 2,2 % (Sembiring, dkk., 2018).



Gambar 1 : Kopi Robusta *Coffea canephora* L.
(Sumber : Dokumentasi Pribadi)

Menurut (Tjitrosoepomo, 2013) tanaman kopi robusta dapat di klasifikasikan sebagai berikut :

Regnum : Plantae
Diviso : Spermatophyta
Subdivisio : Angiospermae
Classis : Dicotyledoneae
Subclassis : Asteridae
Ordo : Rubiales

Familia : Rubiaceae
Genus : *Coffea*
Species : *Coffea canephora* L.

II.2 Pertumbuhan Kalus Kopi Robusta

Kalus merupakan massa sel yang tidak terorganisir yang awalnya merupakan jaringan penutup luka, dimana sel-sel yang pada awalnya dorman (quiescent) terdiferensiasi kembali (dediferensiasi). Dediferensiasi terjadi karena sel-sel tumbuhan (jaringan), yang secara alamiahnya bersifat autotrof yang dikondisikan menjadi heterotrof dengan cara memberikan nutrisi yang cukup kompleks di dalam medium kultur, sehingga sel-sel membelah secara tidak terkendali sehingga membentuk massa sel yang tidak terorganisir (kalus) (Rusdianto dan Ari, 2012).

Proses induksi kalus diawali dengan terjadinya penebalan pada bagian potongan dan daerah pelukaan pada eksplan. Penebalan tersebut merupakan hasil interaksi antara eksplan dan media kultur, zat pengatur tumbuh, dan lingkungan tumbuh sehingga ukuran eksplan semakin besar (Wijaya, dkk., 2017). Pembentukan kalus diawali dengan membesarnya sel-sel epidermis bagian atas kemudian sel-sel tersebut membelah menjadi dua. Ketika tanaman dilukai maka kalus akan terbentuk akibat selnya mengalami kerusakan dan terjadi autolisis (pemecahan), dan dari sel yang rusak tersebut dihasilkan senyawa-senyawa yang merangsang pembelahan sel di lapisan berikutnya sehingga terbentuk gumpalan sel-sel yang terdiferensiasi (Wahyuningtiyas, dkk., 2014).

Perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik merupakan pembentukan, pertumbuhan dan perkembangan embrio dari sel-sel soma atau dari

sel-sel tubuh. Embriogenesis merupakan salah satu teknik yang menguntungkan untuk propagasi vegetatif massal dari spesies yang mempunyai nilai ekonomi tinggi. Embriogenesis somatik dapat terjadi baik secara langsung maupun secara tidak langsung. Embriogenesis somatik yang terjadi secara tidak langsung diawali dengan pembentukan kalus dan embrioid dapat dihasilkan melalui kultur kalus maupun suspensi sel. Kalus embriogenik dapat dihasilkan dari perlakuan 2,4-D dan atau dikombinasikan dengan zat pengatur tumbuh lain. Perbanyakan tanaman melalui embriogenesis somatik sudah banyak dilakukan baik pada tanaman berdingkas lunak maupun pada tanaman berkayu (Yelnititis, 2012).

Beberapa laporan hasil penelitian menunjukkan bahwa, eksplan yang ditanam pada medium yang mengandung senyawa-senyawa yang bersifat stressor selain 2,4-D, seperti beberapa heavy metal ions (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , dan Co^{2+}), tekanan osmotik yang tinggi (sukrosa, NaCl), dan temperatur tinggi (37°C) juga dapat menginduksi terbentuknya kalus embriogenik (Yelnititis, 2012).

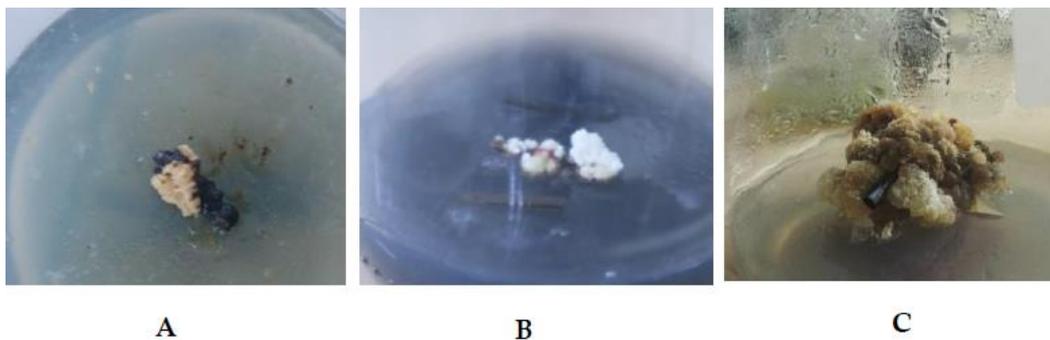
Penggandaan biakan dalam kultur jaringan dapat dilakukan melalui jalur organogenesis dan embriogenesis somatik. Cara yang paling banyak diterapkan untuk meregenerasikan planlet dari kultur jaringan adalah melalui embriogenesis somatik. Embriogenesis somatik merupakan suatu proses dengan sel somatik (baik haploid maupun diploid) berkembang membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet. Cara embriogenesis somatik menghasilkan jumlah propagul banyak dan efisien dalam waktu relatif singkat. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik merupakan metode perbanyakan tanaman yang paling efektif untuk menghasilkan tanaman klonal tetraploid ($2n = 44$) (Arimarsetiowati, 2011).

Komposisi media kultur menentukan lingkungan sel dan jaringan kultur *in vitro*. Pada awal inisiasi, kalus tumbuh pada potongan permukaan eksplan yang

dikulturkan. Pada dasarnya tergantung pada faktor genetik dan lingkungan. Di samping pemilihan jaringan yang tepat sebagai sumber eksplan, keberhasilan embriogenesis somatik juga ditentukan oleh beberapa faktor di antaranya genotipe dan komposisi zat pengatur tumbuh antara auksin dan sitokinin. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik. Selain berpengaruh terhadap diferensiasi sel dalam proses embriogenesis somatic beberapa jenis sitokinin yang biasa digunakan dalam menginduksi embriogenesis somatik pada tanaman kopi adalah BAP, kinetin, zeatin dan 2-ip (Arimarsetiowati, 2011).

II.2.1 Warna Kalus

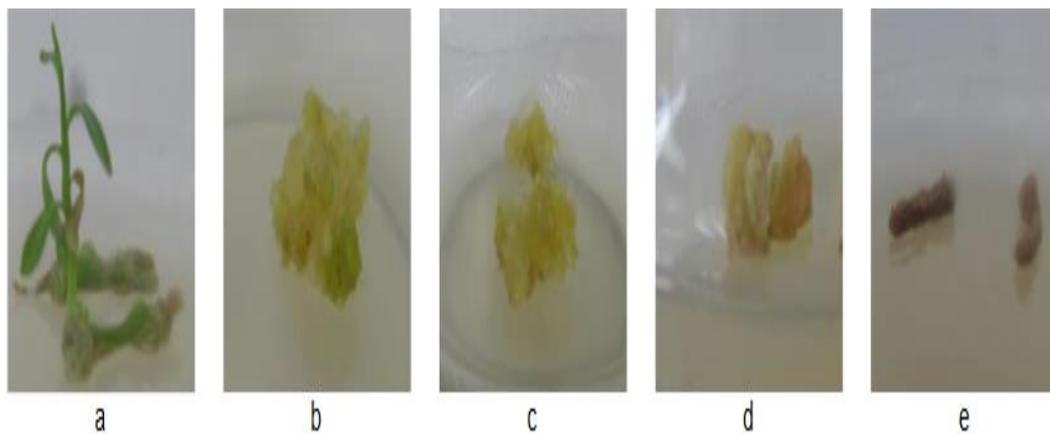
Warna kalus merupakan salah satu indikator dalam teknik kultur jaringan karena pada setiap eksplan akan menghasilkan warna kalus yang berbeda-beda dan dapat dipengaruhi oleh laju pertumbuhan kalus pada media. Setiap perlakuan dengan kombinasi konsentrasi 2,4-D dan BAP menunjukkan warna kalus yang berbeda-beda (Wahyuningtiyas, dkk., 2014).



Gambar 2. Morfologi kalur rejasa (A) kalus yang tumbuh pada perlakuan Pikloram 3,5 ppm dengan kalus meremah warna kekuningan (B) kalus yang tumbuh pada perlakuan 2,4-D 3,5 ppm dengan kalus meremah warna putih (C) kalus yang tumbuh pada perlakuan pikloram 5 ppm dengan kalus meremah warna hijau kekuningan (Wijawati, dkk., 2019).

II.2.2 Tekstur Kalus

Tekstur kalus merupakan salah satu indikator pertumbuhan kalus. Tekstur yang baik adalah tekstur yang remah (*friable*), karena tekstur yang remah lebih mudah untuk dipisah-pisahkan antara sel yang satu dengan yang lainnya. Selain bertekstur remah kalus dapat membentuk tekstur kompak, yaitu kalus yang memiliki sel-sel yang berikatan rapat dan padat. Tekstur pada kalus yaitu kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrisi media, zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur. Tekstur kalus yang kompak merupakan efek dari sitokinin dan auksin yang mempengaruhi potensial air dalam sel. Hal ini menyebabkan penyerapan air dari medium ke dalam sel meningkat sehingga sel menjadi lebih kaku. Tekstur kalus yang remah atau mudah pecah dianggap baik karena memudahkan dalam pemisahan menjadi sel-sel tunggal, disamping itu akan meningkatkan aerasi oksigen antar sel dengan demikian, dengan tekstur tersebut upaya untuk memperbanyak dalam hal jumlah kalus yaitu melalui kultur suspensi lebih mudah (Wahyuningtiyas, dkk., 2014).



Gambar 3. Tekstur kalus yang terbentuk pada berbagai perlakuan: a) Hijau Padat dan Tumbuh Planlet; b) Putih Kehijauan remah; c) Putih Kekuningan remah (*embryogenic*); d) Kuning Kompak; dan e) Cokelat Kompak (Mahadi, dkk., 2016).

II.3 Peranan Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dan Kinetin Terhadap Pertumbuhan Kalus

Zat pengatur tumbuh merupakan salah satu faktor terpenting dalam keberhasilan pertumbuhan tanaman yang dikulturkan. Zat pengatur tumbuh tanaman dapat dibedakan menjadi zat pengatur tumbuh endogen dan eksogen. Zat pengatur tumbuh endogen disebut fitohormon, sedangkan zat pengatur tumbuh eksogen disebut zat pengatur tumbuh sintetis. Zat pengatur tumbuh dalam tanaman terdiri dari 5 kelompok yaitu auksin, giberelin, etilen, sitokinin dan asam absisat (ABA) (Kartikasari, dkk., 2013).

Zat pengatur tumbuh yang paling berpengaruh pada induksi kalus adalah auksin dan sitokinin. Penggunaan auksin (2,4-D) dan sitokinin (BA atau kinetin) akan meningkatkan proses induksi kalus. Penambahan auksin atau sitokinin ke dalam media kultur dapat meningkatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen di dalam sel, sehingga menjadi “faktor pemicu” dalam proses tumbuh dan perkembangan jaringan (Sitinjak, dkk., 2015).

Kombinasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan ke dalam medium merupakan faktor utama penentu keberhasilan kultur *in vitro*. 2,4-D efektif untuk merangsang pembentukan kalus karena aktivitas yang kuat untuk memacu proses diferensiasi sel, organogenesis dan menjaga pertumbuhan kalus. Beberapa golongan sitokinin yang sering digunakan dalam metode kultur jaringan untuk menginduksi kalus adalah BA dan kinetin (Sitinjak, dkk., 2015).

Auksin adalah senyawa yang berpengaruh terhadap perkembangan sel, menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air dan melenturkan atau melunakkan dinding sel yang

diikuti menurunnya tekanan dinding sel sehingga air dapat masuk ke dalam sel yang disertai dengan kenaikan volume sel. 2,4-D merupakan golongan auksin sintesis yang mempunyai sifat stabil, karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan sel atau pemanasan pada proses sterilisasi tersebut (Kartikasari, dkk., 2013).

Zat pengatur tumbuh auksin yang sering ditambahkan dalam media kultur adalah asam 2,4-diklorofenoksi asetat (2,4-D). Zat pengatur tumbuh ini bersifat stabil karena tidak mudah mengalami kerusakan oleh cahaya maupun pemanasan pada waktu sterilisasi. Penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid (Rahayu, dkk., 2003).

Sitokinin merupakan senyawa yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sama halnya dengan kinetin (*6-furfurylaminopurine*). Sitokinin berperan merangsang pertumbuhan sel dalam jaringan yang disebut eksplan dan merangsang pertumbuhan tunas daun (Kartikasari, dkk., 2013). Penambahan zat pengatur tumbuh sangat menentukan keberhasilan kultur jaringan. Kinetin (*6-furfuryl amino purine*) merupakan zat pengatur tumbuh golongan sitokinin yang telah banyak digunakan dalam kultur jaringan. kinetin adalah sitokinin yang paling potensial menginduksi pertumbuhan tunas pada tanaman kehutanan (Putriana, dkk., 2019).

II.4 Lingkungan Tumbuh Tanaman Kopi

kondisi lingkungan yang paling berpengaruh terhadap perubahan morfologi, pertumbuhan, dan produksi kopi adalah tinggi tempat dan tipe curah

hujan. Perubahan morfologi dan pertumbuhan tanaman akan mempengaruhi kebiasaan tanaman. Secara garis besarnya terdapat dua jenis kopi yang keduanya tumbuh dan berkembang secara optimal pada dua kondisi iklim dan tanah yang berbeda. Kedua jenis kopi tersebut yaitu kopi arabika untuk dataran tinggi dan kopi robusta untuk dataran menengah sampai rendah. Pertanaman kopi sering sangat heterogen dan mutunya rendah karena benih yang ditanam bukan varietas anjuran dan tidak sesuai dengan kondisi lingkungan setempat (Refitri, dkk., 2016).

Dari beberapa definisi diatas dapat disimpulkan bahwa Indonesia dengan iklim tropis ini menjadi daerah yang ideal dan potensial untuk ditanami kopi, seperti di daerah Jawa, Bali dan Sulawesi Selatan. Selain itu perkembangan produksi kopi di Indonesia pun cukup baik. Iklim yang menentukan seberapa besar tingkat keberhasilan dalam penanaman kopi karena kualitas kopi yang baik sangat tergantung pada jenis bibit yang ditanam dan dapat mempengaruhi perkembangan hama penyakit serta produksi (Refitri, dkk., 2016).

Menurut (Hadi, 2014) Persyaratan tumbuh tanaman kopi Robusta yaitu :

a. Iklim

1. Tinggi tempat 10-600 mdpl.
2. Curah hujan 1.250-2.500 mm/th.
3. Bulan kering (curah hujan <60 mm/bulan) + 3 bulan.
4. Suhu udara 21-24⁰C.

b. Tanah

1. Kemiringan tanah kurang dari 30%.
2. Kedalaman tanah efektif lebih dari 100 cm.
3. Tekstur tanah berlempung (loamy) dengan struktur tanah lapisan atas remah.

4. Sifat kimia tanah (terutama pada lapisan 0-30 cm) :
 - a. Kadar bahan organik >3,5% atau kadar C >2%.
 - b. Nisbah C/N antara 10-12.
 - c. Kapasitas Pertukaran Kation (KPK) >15 me/100 g tanah.
 - d. Kejenuhan basa >35%.
 - e. pH tanah 5,5-6,5
 - f. Kadar unsur hara N, P, K, Ca, Mg cukup sampai tinggi.

II.5 Kultur Jaringan Tumbuhan

Kultur jaringan adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan, organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali. Sel, jaringan dan organ tanaman ditumbuhkan dalam suatu lingkungan yang terkendali dan dalam keadaan aseptik atau bebas mikroorganisme. Perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan sangat berbeda dibandingkan dengan perbanyakan secara konvensional karena perbanyakan melalui kultur jaringan memungkinkan perbanyakan tanaman dalam skala besar dengan waktu yang relatif lebih cepat (Nofrianinda, dkk., 2017).

Teknik kultur jaringan menekankan lingkungan yang sesuai agar eksplan dapat tumbuh dan berkembang. Lingkungan yang sesuai akan terpenuhi apabila media yang dipilih mempertimbangkan segala sesuatu yang dibutuhkan oleh tanaman. Salah satu faktor penentu keberhasilan pelaksanaan kerja kultur jaringan adalah pemberian nutrisi dalam jumlah dan perbandingan yang benar pada medium kultur. Medium yang dipergunakan pada kultur in vitro tumbuhan ada bermacam-macam. Pemilihan medium tergantung pada jenis tanaman yang akan digunakan (Nofrianinda, dkk., 2017). Kegunaan utama dari kultur jaringan adalah

mendapatkan tanaman baru dalam jumlah banyak, waktu yang relatif singkat, mempunyai sifat fisiologis dan morfologi sama persis dengan tanaman induknya. Dari teknik *in vitro* ini diharapkan dapat diperoleh tanaman baru yang bersifat unggul (Isda dan Fatonah, 2014).

II.6 Media Kultur

Media merupakan faktor utama dalam perbanyakan dengan kultur jaringan. Keberhasilan perbanyakan dan perkembangbiakan tanaman dengan metode kultur jaringan secara umum sangat tergantung pada jenis media. Media tumbuh pada kultur jaringan sangat besar pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan serta bibit yang dihasilkannya (Tuhuteru, dkk., 2012).

Media MS (Murashige dan Skoog) merupakan media yang sangat luas pemakaiannya karena kelebihan dari medium MS ini memiliki kandungan nitrat, kalium dan ammonium yang tinggi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman. Meskipun demikian, kandungan garam yang tinggi dalam media tidak selalu optimal untuk pertumbuhan dan perkembangan eksplan dan planlet secara *in vitro* (Setiawati, dkk., 2018).

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

III.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu autoklaf, LAF (*Laminar Air Flow*), oven, timbangan analitik, gelas kimia, gelas ukur, erlenmeyer, pipet volume, pipet tetes, spatula, pH meter, *hot plate* dengan *magnetic stirrer*, botol kultur, batang pengaduk, cawan petri, pinset, *scapel*, gunting, panci, kompor, ATK serta kamera.

III.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah eksplan daun kopi Robusta *Coffea canephora* L. yang di ambil di Sinjai, Provinsi Sulawesi Selatan. Media Murashige Skoog (MS) instan, agar-agar bubuk, hormon 2,4-D, hormon Kinetin, gula 30 g/L, Kalium hidroksida (KOH 1 N), alkohol 70%, alkohol 96%, aquades, *sodiumhypochlorite* 10%, larutan fungisida yang berbahan aktif Mankozeb 80%, larutan bakterisida (berbahan dasar streptomisin sulfat 15% dan oksitetrasiklin 1,5%), asam chloride (HCL 1 N), plastik sampel, karet gelang, tissue, korek api, *hansprayer*, koran, *aluminium foil* dan *cling wrap*.

III.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pola faktorial (2 faktor) yaitu :

- a. Faktor pertama dengan konsentrasi 2,4-D terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu:

A0 : Tanpa Perlakuan

A1: Perlakuan dengan penambahan 2,4-D 1 ppm

A2: Perlakuan dengan penambahan 2,4-D 2 ppm

A3: Perlakuan dengan penambahan 2,4-D 3 ppm

b. Faktor kedua dengan konsentrasi Kinetin terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu:

B0 : Tanpa Perlakuan

B1: Perlakuan dengan penambahan Kinetin 0,5 ppm

B2: Perlakuan dengan penambahan Kinetin 1 ppm

B3: Perlakuan dengan penambahan Kinetin 1,5 ppm

Kombinasi perlakuan akan disajikan pada tabel 3.1 sebagai berikut:

Kinetin 2,4-D	B0 (0 ppm)	B1 (0,5 ppm)	B2 (1 ppm)	B3 (1,5 ppm)
A0 (0 ppm)	A0B0	A0B1	A0B2	A0B3
A1 (1 ppm)	A1B0	A1B1	A1B2	A1B3
A2 (2 ppm)	A2B0	A2B1	A2B2	A2B3
A3 (3 ppm)	A3B0	A3B1	A3B2	A3B3

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan 2,4-D dan Kinetin

Kombinasi kedua faktor tersebut menghasilkan 16 kombinasi perlakuan yang diulang sebanyak 3 kali pengulangan, maka jumlah total botol percobaan seluruhnya adalah 48 botol. Setiap botol kultur masing-masing 1 eksplan.

III.3 Pelaksanaan

III.3.1 Sterilisasi Peralatan

Alat-alat yang digunakan untuk penanaman harus dalam keadaan steril. Sebelum di sterilkan terlebih dahulu dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air mengalir sampai bersih, Alat-alat kemudian di bungkus dengan kertas kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 60 menit menggunakan autoklaf. Sterilisasi botol dilakukan setelah botol dicuci dengan bersih. Botol kultur steril kemudian disimpan pada tempat yang bersih dan siap untuk digunakan. Alat-alat tanam seperti pinset dan skalpel dapat disterilkan kembali dengan melidah apikan di atas spiritus, setelah dicelupkan pada alkohol 96% sebelum penanaman dilakukan dengan tujuan agar tetap steril saat penanaman berlangsung.

III.3.2 Sterilisasi Ruang Kerja

Laminar Air Flow (LAF) sebelum digunakan terlebih dahulu disemprotkan alkohol 70% dan di bersihkan menggunakan *tissue* agar menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaan LAF. Kemudian dinyalakan lampu UV \pm 30 menit sebelum penanaman. Kemudian dimatikan, dan dinyalakan lampu blower selama \pm 5 menit dan setelah itu dinyalakan lampunya.

III.3.3 Sterilisasi Eksplan

Daun muda kopi robusta *Coffea canephora* L. diambil dan dicuci dengan detergen dan dikocok kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih, dibilas lagi dengan aquades. Daun muda yang telah bersih direndam dalam fungisida yang berbahan aktif Mankozeb 80% dengan konsentrasi 0,25% selama 15 menit, lalu dibilas sampai bersih. Sterilisasi selanjutnya dilakuan di LAF (*Laminar Air Flow*) kemudian disterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 3 menit dan direndam dengan *Klorin* 0,25% dan 0,35% secara bertingkat selama 7 menit,

kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit. Kemudian dicelupkan pada alkohol 70% selama 30 detik, selanjutnya dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

III.4 Pembuatan Untuk Larutan Stok

III.4.1 Pembuatan Larutan Stok ZPT (Zat Pengatur Tumbuh)

Pembuatan larutan stok 2,4-D, dilakukan dengan cara menimbang bubuk hormon sebanyak 0,1 gram, lalu ditambahkan alkohol 50% sedikit demi sedikit, kemudian di aduk hingga homogen lalu dilarutkan dalam aquades steril 100 ml. kemudian dimasukkan ke dalam botol yang diberi label dan disimpan di dalam lemari pendingin. Untuk pembuatan larutan stok Kinetin dilakukan dengan menimbang bahan sebanyak 0,1 gram dan ditambahkan HCl 1N sedikit demi sedikit, kemudian di aduk hingga homogeny \pm 30 menit, lalu ditambahkan aquades sebanyak 100 mL sampai larutan berwarna bening. Selanjutnya dimasukkan ke dalam botol, lalu diberi label untuk selanjutnya di simpan di dalam lemari pendingin. Untuk memperoleh konsentrasi masing-masing hormon 2,4-D dan Kinetin dalam perlakuan perlu dilakukan pengenceran.

III.5 Pembuatan Medium Murashige and Skoog (MS)

Media dasar yang digunakan adalah media MS (Murashige dan Skoog) instan. Pembuatan medium 1 L dibutuhkan media MS instan sebanyak 4,43 g, dicampurkan dengan sukrosa 30 g/L dan agar-agar 7 gr/L, dan aquades hingga volume 1 liter. Kemudian dilarutkan ke dalam gelas kimia dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan di letakkan diatas *hotplate* sampai homogen. Larutan media yang telah bercampur dengan sempurna, diukur tingkat keasaman larutannya dengan menggunakan pH meter keasaman larutan media yang diinginkan adalah 5,6-5,8. Apabila keasaman media yang didapatkan <5,6 maka ditambahkan beberapa tetes larutan KOH dengan konsentrasi 1 N jika media memiliki

keasaman >5,8 maka ditambahkan beberapa tetes HCl 1 N. selanjutnya media yang telah bercampur dimasak hingga medium mendidih.

III.5.1 Pembuatan Medium MS + 2,4-D dan Medium MS + Kinetin

Untuk memudahkan pembuatan medium dengan 4 taraf konsentrasi yang berbeda, maka medium MS 1.000 ml dibagi menjadi 4 bagian, sehingga menjadi 250 ml. Untuk konsentrasi 0 ppm 2,4-D (A₀), tidak ada penambahan hormon 2,4-D. Konsentrasi 1 ppm 2,4-D (A₁), Medium MS ditambahkan 1 ppm 2,4-D (0,25 ml larutan stok 2,4-D). Konsentrasi 2 ppm 2,4-D (A₂), Medium MS ditambahkan 2 ppm 2,4-D (0,5 ml larutan stok 2,4-D). Konsentrasi 3 ppm 2,4-D (A₃), Medium MS ditambahkan 3 ppm 2,4-D (0,75 ml larutan stok 2,4-D). Sedangkan untuk medium Ms ditambahkan hormon Kinetin dibagi juga menjadi 4 bagian, sehingga menjadi 250 ml. Untuk konsentrasi 0 ppm Kinetin (B₀), tidak ada penambahan hormon Kinetin. Konsentrasi 0,5 ppm Kinetin (B₁), Medium MS ditambahkan 0,5 ppm kinetin (0,125 ml larutan stok Kinetin). Konsentrasi 1 ppm Kinetin (B₂), Medium MS ditambahkan 1 ppm Kinetin (0,25 ml larutan stok Kinetin). Konsentrasi 1,5 ppm Kinetin (A₃), Medium MS ditambahkan 1,5 ppm Kinetin (0,375 ml larutan stok Kinetin). Selanjutnya dilarutkan ke dalam gelas kimia dengan menggunakan magnetic stirrer dan diletakkan diatas hotplate sampai homogen. Selanjutnya, medium dituangkan ke dalam botol kultur yang telah disiapkan dengan takaran 250 ml untuk 9-10 botol kultur. Sterilisasi medium dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 17,5 psi dengan suhu 121⁰C selama 15 menit, lalu di simpan di ruang kultur pada suhu 25⁰C sebelum digunakan.

III.5.2 Pembuatan Medium MS + 2,4-D + Kinetin

Tabel 2. Pembuatan Medium MS + 2,4-D + Kinetin

2,4-D Kinetin	1 ppm (0,25 ml)	2 ppm (0,5 ml)	3 ppm (1,5 ml)
0,5 ppm (0,125 ml)	1 ppm 2,4-D + 0,5 ppm Kinetin	2 ppm 2,4-D + 0,5 ppm Kinetin	3 ppm 2,4-D + 0,5 ppm Kinetin
1 ppm (0,25 ml)	1 ppm 2,4-D + 1 ppm Kinetin	2 ppm 2,4-D + 1 ppm Kinetin	3 ppm 2,4-D + 1 ppm Kinetin
1,5 ppm (0,375 ml)	1 ppm 2,4-D + 1,5 ppm Kinetin	2 ppm 2,4-D + 1,5 ppm Kinetin	3 ppm 2,4-D + 1,5 ppm Kinetin

Untuk memudahkan pembuatan medium dengan 9 taraf konsentrasi yang berbeda, maka medium MS 1.000 ml dibagi menjadi 4 bagian sehingga menjadi 250 mL. Untuk pembuatan medium MS + 2,4-D + Kinetin, maka dilakukan penambahan medium MS dengan berbagai konsentrasi 2,4-D + Kinetin (Tabel. 2). Selanjutnya dilarutkan dalam gelas kimia dengan menggunakan *magnetic stirrer* dan diletakkan diatas *hotplate* sampai homogen. Setelah itu dituangkan ke dalam botol yang telah disiapkan dengan takaran 250 ml untuk 5-10 botol kultur. Sterilisasi medium dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 17,5 psi dengan suhu 121 °C selama 15 menit, lalu disimpan di ruang kultur pada suhu 25°C sebelum digunakan.

III.6 Penanaman Eksplan

Penanaman dilakukan secara aseptik dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Eksplan yang telah disterilisasi dipotong $\pm 1 \text{ cm}^2$ dengan menggunakan pisau *scalpel* kemudian ditanam pada botol yang berisi media Murashige and Skoog (MS) yang ditambahkan ZPT 2,4-D dan Kinetin dengan posisi daun terlungkup, setiap botol kultur terdiri dari satu eksplan. Setelah itu botol kultur ditutup

kembali dengan *aluminium foil* dan di *cling wrap*. Selanjutnya disimpan di ruang inkubasi dengan suhu $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dengan kelembaban relative 60% selama 2 bulan.

III.7 Pemeliharaan Eksplan

Sebelum penelitian dimulai, penyemprotan botol-botol kultur dilakukan setiap hari dengan menggunakan alkohol 70%. Alat-alat selain botol kultur dibungkus dengan kertas sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Pemeliharaan pada penelitian ini bertujuan untuk menjaga kebersihan secara aseptis, dengan memisahkan botol-botol yang telah terkontaminasi oleh mikroorganisme (bakteri atau jamur) dari ruang inkubasi.

III.8 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan pada penelitian ini yaitu:

1. Hari Munculnya Kalus

Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung hari saat kalus muncul pertama kali yang dinyatakan dalam HST (Hari Setelah Tanam). Ditandai dengan adanya pembengkakan atau munculnya jaringan yang ditandai dengan adanya warna.

2. Warna Kalus

Pengamatan warna kalus dilakukan secara visual yaitu di akhir penelitian. Warna kalus dapat bermacam-macam yaitu dapat berwarna putih bening, putih kecoklatan, putih kekuningan, kuning, kuning kecoklatan, coklat, coklat kehitaman dan hitam.

3. Tekstur Kalus

Pengamatan tekstur kalus dilakukan di akhir penelitian yaitu secara visual, dengan mengamati karakteristik kalus tersebut. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi dua yaitu tekstur kompak (permukaan kalus mengkilap dan seluruh

permukaan rata) dan tekstur remah (permukaan kalus tidak mengkilap dan bergelombang).

4. Berat Basah Kalus

Pengukuran dilakukan pada akhir pengamatan (60 HST) dengan cara ditimbang menggunakan timbangan analitik. Kalus yang ditimbang adalah yang sudah dibersihkan dari sisa media secara terpisah.

III.2.9 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa pengamatan secara visual meliputi morfologi kalus, sedangkan data kuantitatif berupa berat basah kalus. Data kualitatif dianalisis menggunakan analisis secara deskriptif. Sedangkan data kuantitatif dianalisis menggunakan uji statistik ANAVA (Analisis Varian) dua jalur. Bila terdapat perbedaan nyata maka dilanjutkan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf 5%.