

**INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L.
ASAL BULUKUMBA DENGAN PENAMBAHAN HORMON 2,4 - D
(Dichlorophenoxy acetic acid) DAN BAP (Benzyl Amino Purin) SECARA *IN*
*VITRO***

AULIA MAWADDAH RAHMAN

H411 16 015



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

**INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L.
ASAL BULUKUMBA DENGAN PEDNAMBAHAN HORMON 2,4 - D
(Dichlorophenoxy acetic acid) DAN BAP (Benzyl Amino Purin) 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

AULIA MAWADDAH RAHMAN

H411 16 015

DEPARTEMEN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2020

HALAMAN PENGESAHAN

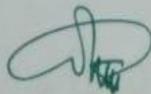
INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L.
ASAL BULUKUMBA DENGAN PEDNAMBAHAN HORMON 2,4 - D
(Dichlorophenoxy acetic acid) DAN BAP (Benzyl Amino Purin) SECARA *IN*
VITRO

Disusun dan diajukan oleh:

AULIA MAWADDAH RAHMAN
H411 16 015

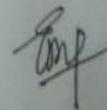
Disetujui oleh

Pembimbing Utama



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

Pembimbing Pertama



Dr. Eya 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 BULUKUMBA DENGAN PENAMBAHAN HORMON 2,4 - D (Dichlorophenoxy acetic acid) DAN BAP (Benzyl Amino Purin) 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, Rahman Anwar dan ibunda Ida Astanti Saleh. Terima kasih atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik moril maupun materil. Terima kasih untuk segala pengertian dan dukungan. Terima kasih karena selalu menjadi motivasi dan alasan utama penulis untuk segera menyelesaikan skripsi ini, semoga ini bisa membuat ayahanda dan ibunda bahagia dan bangga.

Kepada bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si selaku pembimbing utama dan ibu Dr. Eva Johannes, M.Si. selaku pembimbing pertama, penulis mengucapkan banyak terimakasih atas bimbingan dan arahnya 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. Dr. Rosana Agus, M.Si. dan Bapak Dr. Ir. Slamet Santosa selaku penguji sidang sarjana terima kasih atas segala saran dan ilmunya.
4. 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.

5. Kepada UPT. Bonto-Bonto Kabupaten Gowa, terkhusus kepada Laboratorium Kultur Jaringan. Terima kasih karena telah mengizinkan penulis melaksanakan proses penelitian di Laboratorium Kultur Jaringan UPT Bonto-Bonto Kabupaten Gowa serta telah memebrikan banyak ilmu dan pengalaman selama disana. Terima kasih pula kepada Kepala Laboratorium Kultur Jaringan UPT. Bonto-Bonto, Ibu Darni beserta para stafnya, atas segala bimbingan, latihan, ilmu, serta ide yang telah diberikan kepada penulis.
6. Kepada Pak Mansyur, yang selalu siap membantu mulai dari awal penelitian sampai berakhirnya penelitian penulis, serta siap dihubungi setiap saat. Terima kasih telah memberikan banyak pengalaman baru selama penulis tinggal di sana selama sebulan.
7. 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.
8. Kepada keluarga besar, adik-adik dan sepupu-sepupu penulis mengucapkan terima kasih telah menyemangati dan terima kasih atas segala dukunganya.
9. Kepada teman sepenelitian dan seperjuangan, Wiwik Pratiwi Ruslan, Hasmawati dan Syianto Alam Mulyoto terima kasih untuk segala bantuannya.
10. Kepada saudari Wiwik Pratiwi Ruslan terima kasih yang paling khusus dari penulis karena telah telah menjadi orang paling baik hati, berjasa, paling megerti keadaan serta selalu jadi pendengar terbaik untuk segala keluh kesah

penulis, terima kasih karena selalu menemani disaat suka dan duka. Semoga selalu dalam lindungan Tuhan.

11. Kepada Saudara Dewi, Imma, Wiwik, Fahrani, Fatimah, Syianto dan Kak Putri terima kasih selalu meluangkan waktu untuk mendengarkan keluh kesah penulis dan mendampingi penulis dalam melakukan penelitian
12. Kepada sahabat seperjuangan Sri Sulastriani, S.Si, Winda Winarti, Nurhikmah, S.Si, Adhythya Putri Rachmadani Yunus, Firdha Nurhikmah, Wiwik Pratiwi Ruslan dan Siti Hasmirawati Basir, S.Si, terima kasih yang paling dalam karena selalu menyemangati, mendukung dan memotivasi penulis dalam perkuliahan, penelitian hingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini. Semoga selalu dalam keberkahan dan kebahagiaan.
13. 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 19 Juni 2020

Penulis

ABSTRAK

Penelitian ini berjudul “Induksi Kalus Tanaman Kopi Robusta *Coffea canephora* L. Asal Bulukumba Dengan Penambahan Hormon 2,4-D (Dichlorophenoxy Acetic Acid) dan BAP (Benzyl Amino Purin) Secara In Vitro. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi 2,4-D dan BAP dan konsentrasi yang terbaik untuk pertumbuhan kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. asal Bulukumba. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Provinsi Sulawesi Selatan dan di Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin pada Bulan Maret-Mei 2020. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dua factorial 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 BAP (1 ppm, 2 ppm dan 3 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 pemberian kombinasi hormon 2,4-D dan BAP. pada konsentrasi 2,4-D 2 ppm dan BAP 0 ppm memberikan pengaruh yang signifikan terhadap pertumbuhan kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. Asal Bulukumba dengan hasil rata waktu kalus tercepat, warna kalus putih sampai putih kekuningan, tekstur kalus remah dan berat basah kalus yaitu 0,23 g.

Kata Kunci : Kalus, 2,4-D, BAP, Kopi Robusta *Coffea Canephora* L., Kultur Jaringan

ABSTRACT

This study is entitled "Callus Induction of Robusta *Coffea canephora* L. Coffee Plant from Bulukumba with the addition of 2,4-D Hormone (Dichlorophenoxy Acetic Acid) and BAP (Benzyl Amino Purin) in vitro. This study aims to determine the effect of providing a combination of 2,4-D and BAP and the best concentration for the growth of Robusta coffee *Coffea canephora* L. from Bulukumba. The study was conducted at the Tissue Culture Laboratory, UPT Hortikultura Seed Institute of South Sulawesi Province. Plants in 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 BAP concentration (1 ppm, 2 ppm and 3 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 administration of a combination of 2,4-D and BAP hormones. At a concentration of 2,4-D 2 ppm and BAP 0 ppm had a significant effect on the growth of callus Robusta coffee *Coffea canephora* L. Origin Bulukumba with the fastest average call time results, callus color white to yellowish white, callus crumb texture and wet callus weight ie 0.23 gr.

Keywords: Callus, 2,4-D, BAP, Robusta Coffee *Coffea Canephora* L., Tissue Culture

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
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 Sejarah Kopi Di Indonesia	6
II.2 Deskripsi Tanaman Kopi Robusta	7
II.2.1 Morfologi Kopi Robusta.....	8
II.2.2 Sistematika Kopi Robusta	9
II.2.3 Persyaratan Tumbuh Tanaman Kopi Robusta	9
II.3 Kultur Jaringan	11
II.4 Kultur Kalus.....	14
II.4.1 Tekstur Kalus.....	15
II.4.2 Warna Kalus	17

II.4.3 Berat Kalus	19
II.5 Zat Pengatur Tumbuh	19
II.5.1 2,4-D (Dichlorophenoxy acetid acid)	21
II.5.2 BAP (Benzyl Amino Purin).....	22
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	23
III.1 Alat dan Bahan	23
III.1.1 Alat	23
III.1.2 Bahan.....	23
III.2 Rancangan Penelitian	23
III.3 Prosedur Penelitian.....	24
III.3.1 Pengambilan Sampel	24
III.3.2 Sterilisasi Peralatan	25
III.3.3 Sterilisasi Ruang Kerja.....	25
III.3.4 Sterilisasi Eksplan	25
III.4 Pembuatan Untuk Larutan Stok.....	26
III.4.1 Pembuatan Larutan Stok ZPT (Zat Pengatur Tumbuh)	26
III.5 Pembuatan Medium Murashige and Skoog (MS)	26
III.5.1 Pembuatan Medium MS + 2,4-D dan Medium MS + BAP	27
III.5.2 Pembuatan Medium MS + 2,4-D + BAP	28
III.6 Penanaman Eksplan.....	28
III.7 Pemeliharaan Eksplan	29
III.8 Pengamatan.....	29
III.9 Analisis Data	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
IV.1 Waktu Muncul Kalus	31
IV.2 Berat Basah Kalus Daun Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.	36

IV.3 Tekstur Kalus Daun Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.	39
IV.4 Warna Kalus Daun Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	47
V.1 Kesimpulan.....	47
V.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	53

DAFTAR TABEL

Tabel 1 Kombinasi Perlakuan 2,4-D dan BAP	24
Tabel 2 Pembuatan Medium MS + 2,4-D + BAP	28
Tabel 3 Hasil Uji lanjut DMRT Pada Waktu Muncul Kalus	32
Tabel 4 Hasil Uji lanjut DMRT Pada Berat Basah Kalus	35
Tabel 5 Tekstur kalus pada kombinasi 2,4-D dan BAP pada 9 minggu	39
Table 6 Warna Kalus pada Kombinasi 2,4-D dan BAP pada 9 MST.....	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.	10
Gambar 2 Kalus tekstur remah daun Sambung Nyawa	17
Gambar 3 Kalus tekstur kompak daun Sambung Nyawa.....	17
Gambar 4 Keseimbangan auksin dan sitokinin.....	20
Gambar 5 Rumus Kimia 2,4-D (Dichlorophenoxy acetid acid)	22
Gambar 6 Rumus Kimia BAP (Benzyl Amino Purin)	22
Gambar 7 Grafik rata-rata waktu muncul kalus kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.	31
Gambar 8 Grafik rata-rata berat basah kalus kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.	35
Gambar 9 Tekstur Kalus Remah Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.....	40
Gambar 10 Warna kalus yang berumur 9 Minggu Setelah Tanam. a) kalus berwarna putih kekuningan, b) kalus berwarna putih kecoklatan, c) kalus berwarna putih, d) kalus berwarna putih kecoklatan, e) kalus berwarna coklat. ..	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media Murashige and Skoog (MS)	54
Lampiran 2. Deskripsi Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.....	55
Lampiran 3. Skema Kerja	56
Lampiran 4. Proses Kerja Pembuatan Media.....	57
Lampiran 5. Pembuatan Larutan Stok 2,4-D dan BAP	58
Lampiran 6. Pembuatan Medium MS+ 2,4-D, Medium MS+ BAP Dan Medium MS +2,4-D+BAP	59
Lampiran 7. Sterilisasi Eksplan.....	60
Lampiran 8. Penanaman.....	61
Lampiran 9. Pemeliharaan dan Pengamatan	62
Lampiran 10. Hasil Pengamatan Kalus Tanaman Kopi Robusta <i>Coffea Canephora</i> L. Asal Bulukumba Dengan Penambahan 2,4-D dan BAP.....	64
Lampiran 11. Tabel ANOVA dan Uji DMRT Hari Muncul Kalus	70
Lampiran 12. Tabel ANOVA dan Uji DMRT Berat Basah Kalus	71

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kopi adalah salah satu tanaman perkebunan yang penting karena paling tidak dua hal. Yang pertama adalah dari sisi produksi. Tanaman ini merupakan penyokong perekonomian melalui basis produksi bahan mentah dan basis penyerapan tenaga kerja. Kedua, kopi juga memiliki peran di sisi perdagangan. Kopi merupakan hasil pertanian yang diperdagangkan secara luas dan menjadi komoditas yang paling penting setelah minyak bumi (Sahat, *et al.*, 2016).

Indonesia merupakan negara penghasil kopi keempat terbesar di dunia setelah Brazil, Vietnam, dan Colombia. Pasar kopi Indonesia diprediksi meningkat dari 119.200 kg *green bean coffee* pada tahun 2017 menjadi 204.000 ton pada tahun 2018. Hingga saat ini, kopi di Indonesia masih didominasi oleh penjualan dalam negeri dan mulai merangkak menuju penjualan ke luar negeri. Pada tahun 2017 tercatat nilai ekspor kopi Indonesia mencapai 9,2 juta US dollar dan diprediksi akan meningkat 23,4%. Ketersediaan pasar ekspor ini tentu menjadi peluang bagi Negara Indonesia untuk melebarkan sayapnya ke pasar Internasional (Abduh, *et al.*, 2018).

Menurut data Kementerian Pertanian (2017), perkebunan kopi rakyat Indonesia memiliki kecenderungan produktivitas yang rendah. Padahal produktivitas kopi di Indonesia, baik robusta maupun arabika, didominasi oleh perkebunan rakyat dengan presentase 95,37% dari luas perkebunan kopi di Indonesia. Hal ini dapat disebabkan karena berbagai faktor, namun salah satu faktor utamanya adalah kurangnya penerapan teknologi budidaya yang

terstandardisasi (Bursatriannyo, 2015). Permasalahan ini terjadi karena berbagai aspek seperti sosial, politik, ekonomi, infrastruktur yang berada di sekitar petani. Menurut Kementerian Pertanian (2017), konsumsi kopi di Indonesia akan meningkat sekitar 2,5% setiap tahunnya. Peningkatan konsumsi ini berbanding lurus dengan peningkatan jumlah penduduk di Indonesia.

Salah satu jenis kopi yang terkenal di Indonesia adalah robusta (*Coffea canephora* L.). Menurut Kementerian Pertanian (2017), pada tahun 2016, produksi kopi Indonesia telah mencapai 693,3 ribu ton. Kopi robusta memiliki proporsi 81% dari total keseluruhan produksi kopi di Indonesia dan sisanya adalah kopi arabika. (*Coffea arabica* L.) (Abduh, *et al.*, 2018).

Sebagian besar areal, produksi dan ekspor kopi Indonesia adalah jenis kopi robusta yang memang menjadi bagian terbesar pangsa pasar kopi Indonesia di pasar internasional. Walaupun kopi ini ditemukan hampir di semua wilayah Indonesia, tetapi sentra utama kopi robusta berada di tiga provinsi saja, yaitu Lampung, Sumatera Selatan dan Bengkulu. Tiga provinsi ini dikenal sebagai *golden triangle* atau kawasan segitiga emas kopi robusta Indonesia, sebab lebih dari 50% kopi robusta *Coffea canephora* L. yang diekspor ke pasar internasional berasal dari tiga wilayah ini. Karena areal tanaman kopi robusta *Coffea canephora* L. sangat mendominasi pertanaman kopi nasional, maka kopi robusta memiliki nilai strategis untuk pemberdayaan ekonomi rakyat di pedesaan (Kahpi, 2017). Untuk daerah Bulukumba, Menurut dinas kehutanan dan perkebunan (2016), produksi Kopi Robusta tahun 2015 mengalami penurunan dibanding produksi tahun 2014, produksi tahun 2015 hanya sebesar 1.390 ton sedangkan produksi tahun 2014 mencapai 1.403,7 ton. Areal terbesar Kopi Robusta berada di Kecamatan Kindang.

Beberapa ciri khas kopi robusta *Coffea canephora* L. adalah sifatnya yang sangat mudah dibudidayakan oleh petani. memiliki gangguan hama penyakit relatif lebih sedikit. dapat ditanam di bawah tanaman penayang produktif lainnya. pengolahan mudah dilakukan dan biji kopi sangat mudah disimpan. Oleh karena itu kopi robusta *Coffea canephora* L. diusahakan hampir oleh seluruh petani kopi di Indonesia. (Sudjarmoko, 2013).

Salah satu tehnik perbanyak kopi yang bisa dilakukan adalah tehnik kultur jaringan secara *in vitro*. Perbanyak menggunakan biji tidak menjamin benih yang dihasilkan akan sama dengan induknya, karena tanaman yang menyerbuk sendiri masih ada peluang untuk terjadinya penyerbukan silang. Perbanyak vegetatif menghasilkan bibit yang sama dengan induknya, tetapi tidak semua cabang kopi dapat digunakan sebagai sumber bahan tanaman sehingga bibit yang dihasilkan terbatas. Teknik kultur jaringan memberikan alternatif dalam perbanyak bibit kopi. Teknik ini memungkinkan untuk memproduksi bibit yang relatif seragam dalam skala besar, dengan waktu yang lebih singkat, dan bebas hama penyakit (Ibrahim, *et al.*, 2013).

Induksi kalus merupakan salah satu teknik dalam kultur *in vitro* yang bertujuan untuk perbanyak secara masal. Kalus merupakan sumber bahan tanam yang sangat penting dalam meregenerasi tanaman yang baru. Setiap selnya memiliki kemampuan membentuk organisme baru. Oleh karena itu, dengan menginduksi kalus pemenuhan bibit tanaman dapat dicapai dalam waktu singkat dan hasil yang banyak. Selain itu, penggunaan kalus akan sangat menguntungkan karena pembentukan kalus dapat diinisiasi dari jaringan manapun dari tanaman. Keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh media. Media mempunyai 2 fungsi utama, yaitu untuk menyuplai nutrisi dan untuk mengarahkan pertumbuhan

melalui zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh (ZPT) yang sering digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus adalah auksin dan sitokinin. Diantara golongan auksin yang umum digunakan pada media kultur *in vitro* adalah 2,4-D (*2,4-Dichlorophenoxy acetic acid*) (Wahyuningtiyas, *et al.*, 2014).

Menurut Indah dan Ermavitalini (2013), 2,4-D memiliki sifat lebih stabil jika dibandingkan auksin lain seperti IAA karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel tanaman ataupun oleh pemanasan pada saat sterilisasi. Selain auksin, pemberian sitokinin juga berperan dalam menginduksi kalus dimana perannya memicu pembelahan sel. Salah satu golongan sitokinin yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* adalah BAP (*Benzyl amino purine*). BAP memiliki sifat stabil, tidak mahal dan lebih efektif jika dibandingkan dengan kinetin.

Berdasarkan hal di atas dapat diketahui bahwa kopi robusta *Coffea canephora* L. semakin diminati dan harus mengalami peningkatan perbanyakan tanaman dengan tehnik kultur jaringan khususnya di Kabupaten Bulukumba. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang induksi kalus tanaman kopi robusta *Coffea canephora* L. asal Bulukumba dengan penambahan hormon 2,4-D (*Dichlorophenoxy acetic acid*) dan BAP (*benzyl amino purine*) secara *in vitro*.

I. 2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu

1. Mengetahui pengaruh pemberian kombinasi 2,4-D dan BAP terhadap pertumbuhan kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. asal Bulukumba.
2. Mengetahui konsentrasi 2,4-D dan BAP yang terbaik untuk pertumbuhan kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. asal Bulukumba.

I. 3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pertumbuhan kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. asal Bulukumba dari beberapa kombinasi 2,4-D dan BAP 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 2020 - Mei 2020. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan. UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Provinsi Sulawesi Selatan dan Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Sejarah Kopi Di Indonesia

Kopi bukan merupakan tanaman asli kepulauan Indonesia. Pada akhir abad 16 saat Indonesia masih di bawah jajahan Belanda, VOC membawa tanaman kopi Arabika ke dalam negara ini. Mereka tertarik untuk meruntuhkan monopoli Arab terhadap perdagangan kopi dunia. Pemerintah kolonial Belanda pertama kali menanam bibit kopi di sekitar Batavia (Jakarta), sampai ke daerah Sukabumi dan Bogor. Kemudian karena semakin tingginya permintaan pasar, mulai didirikan perkebunan kopi di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan beberapa daerah di Sumatra dan Sulawesi. Perkembangan dari perkebunan kopi ini mendorong perkembangan infrastruktur di Jawa Tengah pada akhir abad 18. Jalanan dan rel kereta api yang sangat dibutuhkan untuk mengangkut kopi dari pedalaman pulau Jawa ke pelabuhan dimana biji-biji kopi diangkut dalam kapal untuk diekspor. Sebelum Perang Dunia kedua, Jawa Tengah memiliki sistem transportasi rel yang sangat kuat. Sistem ini membawa kopi, gula, merica, teh, dan tembakau dari provinsi ke kota pelabuhan Semarang. Indonesia Timur, Timor Timur, dan Flores juga memproduksi kopi dalam periode ini, namun daerah-daerah ini masih berada dalam jajahan Portugis dan sumber bibit kopi Arabika yang ditanam berbeda (Gumulya dan Helmi, 2017).

Mendekati akhir abad ke 19, perkebunan kopi di Indonesia, Sri Lanka, dan Malaysia terserang hama kopi. Hama ini menyebar dengan sangat cepat dan menyapu bersih seluruh perkebunan yang ada. Hal ini meluluh antakkan industri kopi pemerintah kolonial Belanda. Pemerintah Belanda tidak tinggal diam dan

mengimpor bibit kopi Liberika. Varietas ini memiliki popularitas yang tidak berlangsung lama akibat terinfeksi hama yang sama. Kemudian Belanda menanam varietas kopi Robusta yang lebih kuat terhadap hama untuk menggantikan perkebunan kopi yang telah terinfeksi. Hingga kini Robusta menempati sekitar 90% produksi kopi nasional (Gumulya dan Helmi, 2017).

Untuk komoditi kopi telah dikenal oleh penduduk Sulawesi Selatan sejak abad ke 17. Tetapi komersialisasi komoditi kopi baru dilakukan oleh pemerintah Hindia dengan melakukan pemerataan penanaman kopi di daerah pegunungan di wilayah pemerintahan langsung (*Gouvernements Landen*) sejak tahun 1860. Kopi tersebut dibudidayakan dan diproduksi di *Bergregentschappen* di Distrik Utara, Bantaeng di Distrik Selatan, Bulukumba dan Sinjai di Distrik Timur, dan Pulau Selayar. Komoditi kopi diproduksi oleh penduduk melalui kerjasama antara pemerintah Hindia Belanda dengan kepala-kepala kampung. Kopi yang diproduksi diekspor melalui pelabuhan Makassar ke berbagai negara seperti Belanda, Singapura, Amerika, Prancis, Inggris, Papua Nugini, Timor Dili, dan wilayah disekitar Hindia Belanda (Kahpi, 2017).

II.2 Deskripsi Tanaman Kopi Robusta

Kopi robusta pertama kali ditemukan di Kongo pada tahun 1898. Kopi robusta memiliki cita rasa yang lebih pahit, sedikit asam, dan mengandung kafein. Cakupan daerah tumbuh kopi robusta lebih luas daripada arabika yang harus ditanam pada ketinggian tertentu. Penghasil kopi jenis robusta terbesar di dunia adalah Vietnam, sekaligus produsen kopi terbesar di kawasan ASEAN, mengungguli Indonesia di urutan ketiga (Sudarto, 2017).

Kopi Robusta *Coffea canephora* L. 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 (Prastowo, *et al.*, 2010).

II.2.1 Morfologi Kopi Robusta

Kopi Robusta termasuk tanaman menyerbuk silang sehingga harus diperbanyak secara vegetatif untuk menjamin mutu genetik benih yang dihasilkan sama dengan induknya. Perbanyak vegetatif menggunakan teknik setek dibatasi oleh terbatasnya produksi tunas air (*entres*) dan jumlah ruas cabang yang dapat digunakan. Selain itu, kendala lain dalam perbanyak setek adalah akar yang dihasilkan merupakan akar serabut yang dangkal serta terkonsentrasi di sekitar permukaan tanah, sehingga tanaman kopi menjadi mudah rebah bila ditiup angin (Ibrahim dan Hartati, 2017).

Bunga kopi robusta terbentuk pada ketiak daun dari cabang terdapat 4 atau 5 tanda, masing-masing terdiri dari 3 atau 5 bunga. Jadi pada tiap ketiak daun terdapat 12 atau 25 bunga. Pada keadaan yang optimal, jumlah bunga bisa mencapai lebih dari 6000-8000 bunga per pohon. Tetapi bunga yang dapat menjadi buah sampai masak hanya berkisar antara 30-50%. Mahkota bunga berwarna putih, dengan jumlah daun mahkota (*petal*) 3-8 daun mahkota. Penyerbukan (*pollination*) adalah menyerbuk silang (*cross pollinator*). Penyerbukan pada tanaman kopi dibawa oleh angin, Benang sari dari bunga kopi dapat terbawa angin sampai sejauh 100 m dari pohon itu sendiri, namun sebenarnya yang paling baik hanyalah yang dibawa berjarak 35 m dari pohon itu sendiri. Kopi pada umumnya berbunga pada umur 3 tahun, dan berubah pada umur 4 tahun. Buah kopi robusta menjadi masak dalam waktu 10 – 11 bulan (Subandi, 2011).

II.2.2 Sistematika Kopi Robusta

Kedudukan tanaman kopi, khususnya kopi robusta dalam sistematika (Taksonomi) tumbuhan adalah sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 2013) :

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledoneae
Subclassis	: Asteridae
Ordo	: Rubiales
Family	: Rubiaceae
Genus	: <i>Coffea</i>
Spesies	: <i>Coffea canephora</i> L.

II.2.3 Persyaratan Tumbuh Tanaman Kopi Robusta

Tanaman kopi merupakan genus *Coffea* yang termasuk dalam familia *Rubiaceae* dan mempunyai sekitar 100 spesies. Genus *Coffea* adalah salah satu genus penting yang mempunyai nilai ekonomis tinggi dan dikembangkan secara komersial, terutama *Coffea arabika*, *Coffea liberica*, *Coffea canephora* diantaranya kopi Robusta. Tanaman kopi merupakan tumbuhan tropik yang berasal dari Afrika. Meskipun kopi merupakan tumbuhan tropik, kopi memerlukan pohon naungan dan tidak menghendaki suhu tinggi. Suhu di atas 35°C dan suhu dingin dapat merusak panen dan mematikan tumbuhan kopi. Tanaman kopi dapat tumbuh dengan baik pada suhu yang berkisar 15-30 °C dan pada tanah subur dengan sifat tanah antara berpasir dengan cukup humus dan dalam dengan drainase yang cukup baik. Kawasan dengan tanah lempung dan

tanah padas kurang cocok karena tanaman memerlukan tersedianya air tanah yang cukup, tetapi tidak menghendaki adanya genangan air (Kahpi, 2017).



Gambar 1. Kopi Robusta *Coffea canephora* L.
Sumber: Dokumentasi pribadi

Kopi di Indonesia saat ini umumnya dapat tumbuh baik pada ketinggian tempat di atas 700 m di atas permukaan laut (dpl). Dalam perkembangannya dengan adanya introduksi beberapa klon baru dari luar negeri, beberapa klon saat ini dapat ditanam mulai di atas ketinggian 500 m dpl, namun demikian yang terbaik seyogyanya kopi ditanam di atas 700 m dpl, terutama jenis kopi robusta. Curah hujan yang sesuai untuk kopi seyogyanya adalah 1500-2500 mm per tahun, dengan rata-rata bulan kering 1-3 bulan dan suhu rata-rata 15-25 °C dengan lahan kelas S1 atau S2. Ketinggian tempat penanaman akan berkaitan juga dengan citarasa kopi. robusta di Indonesia adalah belum digunakannya bahan tanam unggul yang sesuai dengan agroekosistem tempat tumbuh kopi robusta. Umumnya petani masih menggunakan bahan tanam dari biji berasal dari pohon yang memiliki buah lebat atau bahkan dari benih sapuan. Salah satu upaya untuk meningkatkan produktivitas kopi robusta adalah dengan perbaikan bahan tanam. Penggantian bahan tanam anjuran dapat dilakukan secara bertahap, baik dengan

metode sambungan di lapangan pada tanaman kopi yang telah ada, maupun penanaman baru dengan bahan tanaman asal setek (Prastowo, *et al.*, 2010).

Tanaman kopi dapat tumbuh di berbagai kondisi tanah, dari yang sangat masam ($\text{pH} < 4$) sampai tanah alkalin ($\text{pH} > 8$), dan untuk kopi Robusta umumnya dapat tumbuh pada lahan dengan $\text{pH} > 4,5$. Menurut Forestier (1969) yang disitasi Wilson dan Clifford (1985) dalam Santosa *et al.* (2016), hal tersebut menunjukkan bahwa tanaman kopi Robusta relatif toleran ditanam di lahan masam. Umumnya lahan masam memiliki tingkat kejenuhan aluminium tinggi, tetapi pengaruh cekaman aluminium belum diketahui lebih mendalam terhadap parameter pertumbuhan tanaman kopi.

II.3 Kultur Jaringan

Kultur jaringan tanaman adalah suatu teknik untuk menumbuhkan sel, jaringan ataupun irisan organ tanaman di laboratorium pada suatu media buatan yang mengandung nutrisi yang aseptik (steril) untuk menjadi tanaman secara utuh. Kondisi steril merupakan suatu syarat mutlak keberhasilan pelaksanaan kultur jaringan, sehingga kondisi ini harus tetap dijaga selama proses kultur berlangsung. Walaupun hanya satu spora jamur atau hanya satu sel bakteri yang masuk ke media kultur, maka pekerjaan kultur akan gagal dan tidak akan dihasilkan tanaman baru. Kultur jaringan tanaman didasari oleh teori totipotensi sel (cellular totipotency) yang menyebutkan bahwa setiap sel tanaman memiliki kapasitas untuk beregenerasi membentuk tanaman secara utuh. Tanaman baru yang diperoleh dengan cara ini bersifat identik dengan induknya, dan disebut plantlet (Dwiyani, 2015).

Kultur jaringan merupakan teknik penanaman dengan menggunakan bahan tanam berupa seluruh tanaman, bagian tanaman (daun, batang, tangkai daun, tunas

pucuk, tunas ketiak daun, akar, bunga, buah, dll.), dan bahkan sel tunggal pada media yang mengandung mineral, faktor pertumbuhan, sumber karbon dan zat pengatur tumbuh yang dilakukan secara aseptik (steril). Teknologi ini sangat membantu dalam mempercepat proses pemuliaan konvensional dan metode perbanyakan vegetatif (Purwati dan Sudjindro, 2005). Secara umum Lindsey dan Jones (1990) yang disitasi Yusnita *et al.* (2003) dalam Purwati dan Sudjindro (2005), kelebihan atau keuntungan perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan yaitu:

1. Tidak membutuhkan ruangan yang luas. Perbanyakan dilakukan pada botol-botol kultur sehingga tidak membutuhkan ruangan yang luas.
2. Bebas penyakit, hama, dan virus. Karena perbanyakan dilakukan dalam keadaan aseptik, maka bibit yang dihasilkan terbebas dari bakteri, cendawan, nematoda, maupun hama lain.
3. Waktu untuk perbanyakan cepat dan tidak terbatas. Kondisi untuk perbanyakan melalui kultur jaringan (cahaya, komposisi media, konsentrasi zat pengatur tumbuh, dan suhu) dapat dikontrol, sehingga bibit dapat dihasilkan dalam jumlah banyak pada waktu yang relatif singkat dan tidak terbatas.
4. Tidak tergantung musim atau iklim. Perbanyakan bibit dapat dilakukan secara kontinu karena tidak tergantung musim atau iklim.
5. Menghemat tenaga. Karena tidak memerlukan pemeliharaan yang rumit seperti: penyiraman, pengendalian gulma, hama, dan penyakit, maka akan menghemat tenaga.

Perbanyakan tanaman dengan kultur jaringan dapat menghasilkan benih dalam jumlah banyak dalam waktu singkat, seragam, dan bebas penyakit.

Keberhasilan teknik kultur jaringan dipengaruhi antara lain oleh jenis eksplan, yaitu bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan untuk inisiasi suatu kultur, dan komposisi media yang digunakan. Pada dasarnya, semua tanaman dapat diregenerasikan menjadi tanaman sempurna bila ditumbuhkan pada media yang sesuai. Salah satu komponen media yang menentukan keberhasilan suatu kultur jaringan adalah jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan (Marlina dan Rohayati, 2009).

Banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur *in vitro*, baik faktor dalam seperti kondisi sampel yang dijadikan sebagai eksplan maupun faktor luar seperti media pertumbuhan yang digunakan. Media perumbuhan merupakan campuran berbagai garam mineral, air, asam amino, vitamin, gula, zat pengatur tumbuh, dan pemat. Media pertumbuhan Murashige Skoog (MS) merupakan salah satu media yang penggunaannya lebih luas dalam kultur *in vitro* terutama untuk tumbuhan berkayu (Murni, 2010).

Pemanfaatan teknologi kultur jaringan untuk tujuan perbanyakan bibit telah diaplikasikan pada berbagai tanaman tahunan antara lain jati, ekaliptus, dan akasia. 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. Selain itu teknik perbanyakan dengan kultur jaringan mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan cara-cara tradisional (Nursyamsi, 2010).

II.4 Kultur Kalus

Menurut Katuuk (1989) yang disitasi oleh Nugroho dan Sugito (2005) dalam Karyanti *et al.* (2014), kalus adalah jaringan yang terdiri dari sejumlah sel yang tidak terorganisasi, merupakan bentuk awal calon tunas yang kemudian mengalami proses pelengkapan bagian tanaman seperti daun, batang, dan akar. Dalam kultur jaringan, kalus terbentuk karena luka atau irisan eksplan sebagai respon terhadap auksin dan sitokinin yang tinggi. Sedangkan menurut Hendaryono dan Wijayani (1994) dalam Fauziyyah *et al.* (2012), kalus adalah kumpulan masa sel yang belum terorganisasi (amorphous) yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus.

Sedangkan menurut Rasud dan Bustaman (2019), Indikator adanya pertumbuhan dalam kultur *in vitro* salah satunya adalah penambahan jumlah sel melalui pembentukan kalus. Kalus merupakan massa sel yang tidak terorganisir yang terbentuk pada jaringan luka. Sel kalus terbentuk dari sel meristem atau pun sel yang telah mengalami diferensiasi, seperti sel parenchyma pada daun. Secara *in vitro*, kalus dapat terbentuk pada bekas-bekas luka irisan karena sebagian sel pada permukaan irisan tersebut akan mengalami proliferasi. Adapun tipe-tipe kalus menurut Kesse *et al.* (1991) yang disitasi oleh Sugiyono (1993) dalam Fauziyyah *et al.* (2012), yaitu kalus embriogenik, kalus proliferaatif, dan kalus senesen. Induksi kalus diawali dengan penebalan eksplan pada bagian potongan dan di daerah yang mengalami pelukaan. Penebalan tersebut merupakan interaksi antara eksplan dengan media tumbuh, zat pengatur tumbuh dan lingkungan tumbuh sehingga eksplan bertambah besar (Yelnitis, 2012).

Pembentukan kalus dipengaruhi oleh jenis eksplan dan ZPT (zat pengatur tumbuh yang digunakan). Eksplan daun yang lebih mudah membentuk kalus

adalah daun muda dibandingkan dengan daun yang tua, karena daun yang muda mempunyai jaringan meristematik yang lebih mudah membentuk kalus dibanding yang tua (Hafiizh, *et al.*, 2016). Pembentukan kalus terjadi karena adanya pelukaan yang diberikan pada eksplan, sehingga sel-sel pada eksplan akan memperbaiki sel-sel yang rusak tersebut. Pada awalnya terjadi pembentangan dinding sel dan penyerapan air, sehingga sel akan membengkak selanjutnya terjadi pembelahan sel. Sel dapat melakukan aktivitas metabolik tersebut membutuhkan energi. Sukrosa yang ditambahkan dalam media, akan menjadi sumber energi sel-sel eksplan, sehingga sel dapat mengalami pembentangan dan pembelahan selanjutnya akan membentuk kalus (Sitorus, *et al.*, 2011).

Menurut Pierik (1987) dalam Haryati *et al.* (2017), pertumbuhan kalus dalam satu spesies tanaman dapat berbeda tergantung faktor seperti posisi eksplan semula dalam tanaman dan kondisi pertumbuhan. Pertumbuhan dan morfogenesis *in vitro* dipengaruhi oleh adanya interaksi dan perimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dalam media dan hormon pertumbuhan yang dihasilkan secara endogenous oleh sel-sel yang dikultur.

Kecepatan pembentukan kalus ditentukan oleh daya kerja dari zat pengatur tumbuh yang diberikan dan fitohormon yang terdapat pada eksplan. Indah & Ermavitalini (2013) dalam Rasud dan Bustaman (2019), menyatakan bahwa penambahan zat pengatur tumbuh eksogen akan mengubah gradien fitohormon dalam sel-sel eksplan. Efektivitas zat pengatur tumbuh (auksin) eksogen bergantung pada konsentrasi hormon endogen dalam jaringan tanaman.

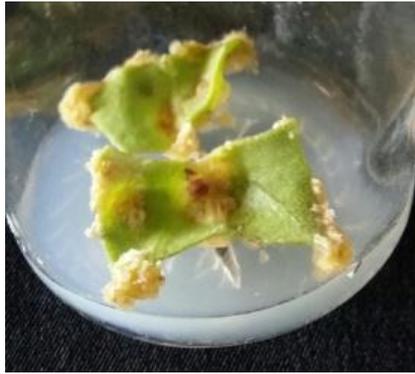
II.4.1 Tekstur Kalus

Tekstur kalus merupakan penanda yang digunakan untuk menentukan kualitas suatu kalus sehingga dapat diketahui sel masih aktif membelah atau telah

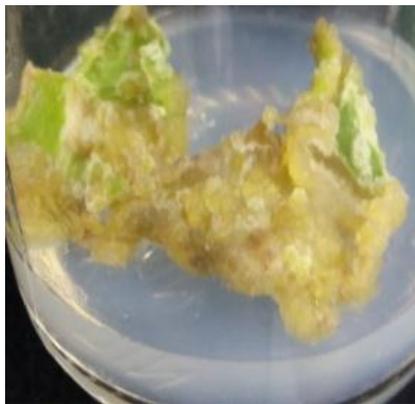
mengalami stagnasi dalam pembelahan selnya (Ariani *et al.* 2016). Tekstur kalus yang dihasilkan dari suatu eksplan yang dikultur sering berbeda. Tekstur pada kalus menurut Pierik (1987) dalam Haryati *et al.* (2017), dapat bervariasi dari kompak hingga meremah, tergantung pada jenis tanaman yang digunakan, komposisi nutrient, zat pengatur tumbuh, dan kondisi lingkungan kultur.

Sedangkan menurut Turhan (2004) dalam Haryati *et al.* (2017), tipe kalus dapat dibedakan menjadi tiga macam yaitu, kompak (*non friable*), intermediet, dan remah (*friable*) Kalus dengan tipe kompak umumnya mempunyai pertumbuhan yang lambat, sulit untuk dipisahkan dan ikatan antar sel terlihat padat. Sedangkan tipe kalus remah memiliki ikatan antar sel yang tampak renggang, serta mudah dipisahkan jika diambil dengan pinset. Menurut Widiarso (2010) dalam Haryati *et al.* (2017), kalus tipe intermediet merupakan massa kalus yang terdiri dari kelompok sel-sel yang sebagian kompak dan sebagian lainnya remah.

Menurut Mahadi *et al.* (2016), tekstur kalus yang remah mengalami pembelahan sel yang cepat daripada tekstur kalus yang kompak. Dominansi tekstur kompak pada penelitian ini dapat disebabkan oleh efek pemberian sitokinin pada media kultur. Sesuai dengan pernyataan Purwianingsih *et al.* (2016), bahwa tekstur kalus kompak merupakan efek dari sitokinin yang berperan dalam transport zat hara. Sitokinin berperan dalam transport air dan zat hara melalui pembuluh angkut dan mempengaruhi potensial osmotik sel. Sukrosa yang terkandung dalam media kultur akan menimbulkan tekanan turgor. Tekanan tersebut muncul akibat adanya perbedaan konsentrasi larutan, sehingga air dan zat hara dari media akan masuk ke dalam sel melalui osmosis dan menyebabkan dinding-dinding sel menjadi kaku, dan membuat kalus menjadi kompak.



Gambar 2. Kalus tekstur remah daun Sambung Nyawa
Sumber: (Indriani dkk., 2016)



Gambar 3. Kalus tekstur kompak daun Sambung Nyawa
Sumber: (Indriani dkk., 2016)

Mahadi *et al.* (2016) bahwa tekstur kompak disebabkan kalus mengalami lignifikasi sehingga mempunyai tekstur yang keras. Dwi *et al.* (2012) menyatakan bahwa tekstur 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.

II.4.2 Warna Kalus

Warna kalus menggambarkan penampilan visual sel-sel kalus sehingga dapat diketahui tingkat keaktifan pembelahan sel-selnya. Warna putih merupakan warna awal saat kalus mulai mengalami inisiasi. Warna kalus menunjukkan tingkat perkembangan kalus yang terbentuk. Menurut Gamborg (1982) dalam Kherasani *et al.* (2017), warna kalus yang terbentuk antara lain kuning, kehijauan,

dan hijau terang. Kalus yang berwarna putih tidak mengandung kloroplas, tetapi mengandung plastid yang berisi butir pati yang sedikit demi sedikit tumbuh menjadi sistem membran yang jelas yang akhirnya terbentuklah proto klorofil dengan paparan cahaya, sehingga kalus menjadi berwarna kekuningan sampai hijau. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik. Warna kalus dari suatu eksplan dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh. Warna kalus yang bermacam-macam diakibatkan oleh adanya pigmentasi cahaya dan asal eksplan.

Warna pigmen putih dan kuning pada kalus menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus tersebut baik. Warna hijau disebabkan kalus mengandung klorofil, akibat interaksi 2,4-D dan BAP (sitokinin) yang berperan dalam pembentukan klorofil pada kalus. Perubahan warna kalus menjadi putih kehijauan, pada sel kalus sudah mulai terbentuk klorofil sebagai reaksi pencahayaan sehingga kloroplas melakukan fotosintesis (Mahadi, *et al.*, 2016).

Rata-rata kalus yang terbentuk tiap perlakuan yang dicobakan menghasilkan warna yang berbeda-beda. Menurut Santosa dan Nursandi (2004) dalam Haryati *et al.* (2017), perubahan warna dari putih kekuningan menjadi kuning kecoklatan disebabkan oleh semakin dewasanya umur sel atau jaringan kalus dan menandakan terjadinya reaksi enzimatik yang mengarah pada sintesis senyawa fenol yang disebut *browning* (pencoklatan). Sedangkan menurut Abdullah *et al.* (1998) Haryati *et al.* (2017), sel-sel yang sehat akan menunjukkan warna kuning bening dan akan berubah menjadi kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua. Warna kalus semakin gelap (kecoklatan) berarti pertumbuhan kalus semakin menurun

II.4.3 Berat Kalus

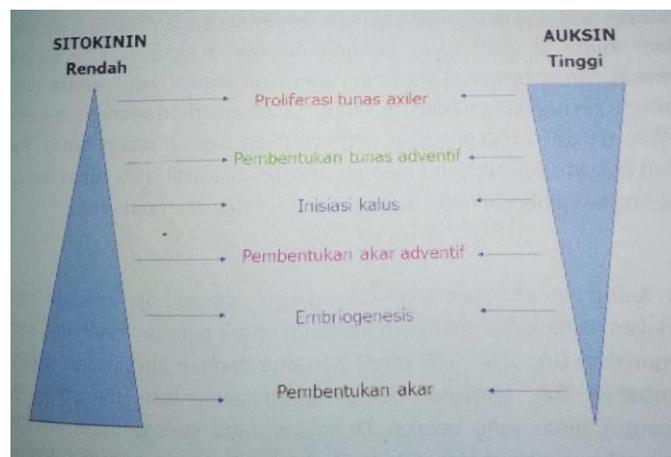
Pertumbuhan kalus pada media kultur biasanya ditentukan dengan mengukur berat kalus. Menurut Andriyani (2010) dalam Setiawati *et al.* (2019), berat basah secara fisiologis terdiri dari dua kandungan materi yaitu air dan karbohidrat. Berat basah kalus yang besar disebabkan oleh kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus. Berat kering merupakan parameter pertumbuhan yang dapat digunakan sebagai ukuran global pertumbuhan tanaman dengan segala peristiwa yang dialaminya. Untuk mendapatkan berat kering dilakukan pengeringan untuk menghilangkan kadar air dan menghentikan aktivitas metabolisme dalam bahan hingga diperoleh berat yang konstan.

II.5 Zat Pengatur Tumbuh

Zat pengatur tumbuh tanaman berperan penting dalam mengontrol proses biologi dalam jaringan tanaman. Perannya antara lain mengatur kecepatan pertumbuhan dari masing-masing jaringan dan mengintegrasikan bagian-bagian tersebut guna menghasilkan bentuk yang kita kenal sebagai tanaman. Zat pengatur tumbuh terdiri dari golongan sitokinin dan auksin. Auksin mempunyai peran ganda tergantung pada struktur kimia, konsentrasi, dan jaringan tanaman yang diberi perlakuan. Pada umumnya auksin digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus, kultur suspensi, dan akar, yaitu dengan memacu pemanjangan dan pembelahan sel di dalam jaringan kambium. Untuk memacu pembentukan kalus embriogenik dan struktur embrio somatik seringkali auksin diperlukan dalam konsentrasi yang relatif tinggi. Penambahan auksin atau sitokinin ke dalam media kultur dapat meningkatkan konsentrasi zat pengatur tumbuh endogen di

dalam sel, sehingga menjadi “factor pemicu” dalam proses tumbuh dan perkembangan jaringan (Lestari, 2011).

Zat pengatur tumbuh sintetis perlu ditambahkan karena zat pengatur tumbuh terbentuk secara alami seringkali tidak mencukupi pertumbuhan jaringan eksplan. Zat pengatur tumbuh yang umum digunakan untuk induksi kalus adalah auksin dan sitokinin. Kadar auksin yang lebih tinggi dari sitokinin memacu pertumbuhan akar, kadar auksin yang lebih rendah dibanding sitokinin memacu pertumbuhan tunas, sementara kadar keduanya dengan konsentrasi yang seimbang akan mengarahkan eksplan pada pembentukan kalus (Khaniyah, *et al.*, 2012).



Gambar 4. Keseimbangan Auksin dan Sitokinin (Widyastuti dan Deviyanti, 2018).

Auksin dan sitokinin adalah zat pengatur tumbuh yang mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur sel, jaringan, dan atau kultur organ. Konsentrasi zat pengatur tumbuh yang berbeda memberikan respon yang berbeda terhadap induksi kalus. Kalus yang tidak muncul dimungkinkan karena eksplan mempunyai kandungan auksin dan sitokinin endogen yang rendah, sehingga masih membutuhkan tambahan auksin atau sitokinin eksogen yang lebih banyak. Perimbangan konsentrasi dan interaksi antar ZPT yang diberikan dalam media dan diproduksi oleh sel secara endogen akan menentukan arah perkembangan

suatu kultur. Cepat lambatnya munculnya suatu kalus dipengaruhi oleh kerja hormon auksin dan sitokinin endogen dan eksogen yang saling berkorelasi (Wahyuningtiyas, *et al.*, 2014).

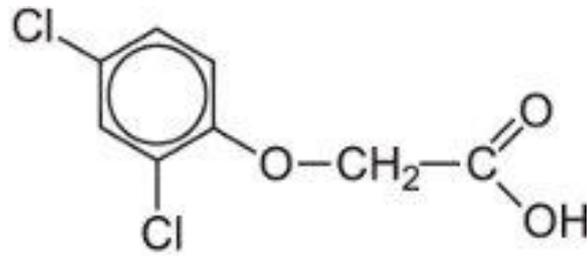
Saat ini dikenal enam kelompok ZPT, yaitu auksin, giberelin, sitokinin, asam absisik (ABA), etilen dan retardan. Salah satu auksin alamiah pada tumbuhan adalah IAA. IAA disintesis dari triptofandi primordial daun, daun muda, dan biji yang sedang berkembang. Sedangkan auksin sintetis terdiri atas IAA, IBA, NAA dan hebisida yang bersifat auksin. Herbisida tersebut adalah 2,4-D, 2, 4, 5 T, Dicamba, Tordon 4-CPA, Picloram dan lain-lain. Sedangkan yang termasuk dalam sitokinin antara lain zeatin, 2-*Ip*, kinetin, Benzyl Amino Purin (BAP) (Widyastuti dan Deviyanti, 2018).

II.5.1 2,4-D (Dichlorophenoxy acetid acid)

2,4-D (*Dichlorophenoxy acetid acid*) merupakan ZPT yang paling sering digunakan pada kultur kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan oragonogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Apabila dibandingkan dengan auksin lainnya seperti IAA, 2,4-D (*Dichlorophenoxy acetid acid*) menunjukkan aktivitas yang lebih kuat. Aktivitas 2-4-D (*Dichlorophenoxy acetid acid*) yang kuat dan optimal ini disebabkan karena gugus karboksil yang dipisahkan oleh karbon atau karbon dan oksigen. 2,4-D merupakan auksin sintesis yang sering digunakan untuk menginduksi embrio somatik (Indah dan Ermavitalini, 2013).

2,4-D sendiri merupakan auksin sintetis yang sering digunakan dalam kultur jaringan tanaman, auksin 2,4-D berperan terhadap pelonggaran dinding sel dengan melepaskan ikatan hidrogen yang terdapat pada dinding sel. Mekanisme pelonggaran dinding sel dipengaruhi oleh proses pengaktifan gen yang terlibat

dalam sintesis protein. Pengontrolan sintesis protein sendiri diatur oleh gen pengatur, gen operator dan gen struktural (Kumianjani, *et al.*, 2015).

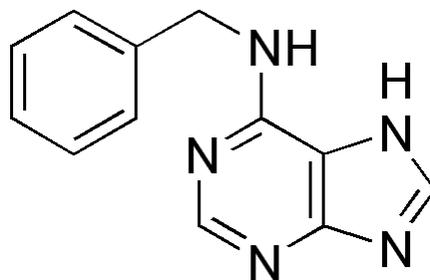


2,4-dichlorophenoxyethanoic acid

Gambar 5. Rumus Kimia 2,4-D (Dichlorophenoxy acetid acid)
Sumber: (Dwiastuti dan Deviyanti, 2018)

II.5.2 BAP (Benzyl Amino Purine)

BAP umum digunakan dalam proses regenerasi kultur *in vitro* karena zat pengatur tumbuh ini berfungsi dalam pembelahan sel dan diferensiasi tunas adventif dari kalus (Indah dan Ermavitalini, 2013). Zat pengatur tumbuh BAP paling banyak digunakan untuk memacu penggandaan tunas karena mempunyai aktivitas yang kuat dibandingkan dengan kinetin. BAP mempunyai struktur dasar yang sama dengan kinetin tetapi lebih efektif karena BAP mempunyai gugus benzil. Umumnya tanaman memiliki respon yang lebih baik terhadap BAP dibandingkan terhadap kinetin dan 2-iP sehingga BAP lebih efektif untuk produksi tunas *in vitro* (Lestari, 2011).



Gambar 6. Rumus Kimia BAP (Benzyl Amino Purin)
Sumber: (Dwiastuti dan Deviyanti, 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*), *hansprayer*, timbangan analitik, gelas kimia, gelas ukur, erlenmeyer, pipet volume, pipet tetes, spatula, pH meter, botol kultur, batang pengaduk, bunsen, cawan petri, pinset, *scapel*, gunting, panci, kompor, lup, 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 Bulukumba, Provinsi Sulawesi Selatan. Media Murashige Skoog (MS) instan, agar-agar bubuk, hormon 2,4-D, hormon BAP, gula 30 g/L, alkohol 70%, alkohol 96%, aquades, *sodium hypochlorite* 0,25% dan 0,35%, larutan fungisida yang berbahan aktif Mankozeb 80%, vitamin C, spirtus, plastik sampel, karet gelang, tissue, korek api, *aluminium foil*, sabun pencuci dan *cling wrap*.

III.2 Rancangan Penelitian

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

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

A0: Tanpa penambahan 2,4 D

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 BAP terdiri dari 4 taraf perlakuan yaitu:

B0: Tanpa penambahan BAP

B1: Perlakuan dengan penambahan BAP 1 ppm

B2: Perlakuan dengan penambahan BAP 2 ppm

B3: Perlakuan dengan penambahan BAP 3 ppm

Kombinasi perlakuan akan disajikan pada tabel 1 sebagai berikut:

Perlakuan		BAP (ppm)			
		0	1	2	3
2,4-D (ppm)	0	A0B0	A0B1	A0B2	A0B3
	1	A1B0	A1B1	A1B2	A1B3
	2	A2B0	A2B1	A2B2	A2B3
	3	A3B0	A3B1	A3B2	A3B3

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

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 Prosedur Penelitian

III.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanaman di lakukan di Bulukumba, Sulawesi Selatan . Pengambilan sampel dilakukan dengan cara menggunting bagian tangkai daun muda tanaman kopi, lalu disimpan kedalam plastic sampel untuk dibawa ke laboratorium.

III.3.2 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 \pm 20 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.3.3 Sterilisasi Ruang Kerja

Laminar Air Flow (LAF). 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.3.4 Sterilisasi Eksplan

Daun muda kopi robusta *Coffea canephora* L. diambil dan dicuci dengan sabun pencuci dan dikocok kemudian dibilas dengan air mengalir sampai bersih, dibilas lagi dengan aquades steril. Daun muda yang telah bersih direndam dalam fungisida yang berbahan aktif Mankozeb 80% sebanyak 2,50 g/L selama 15 menit, lalu dibilas sampai bersih, kemudian direndam dengan *sodium hypochlorite* 0,35% dan 0,25% secara bertingkat selama 7 menit, kemudian dicelupkan pada alkohol 70% selama 30 detik, selanjutnya dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali masing-masing selama 30 detik. Sterilisasi selanjutnya dilakuan di LAF

(*Laminar Air Flow*). Daun yang sudah steril dipotong-potong dengan ukuran ± 1 cm x 1 cm dan ditumbuhkan pada media kultur.

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 100 mg lalu ditambahkan perlahan-lahan alcohol 50% kemudian aduk menggunakan batang pengaduk sampai benar-benar homogeny, selanjutnya ditambahkan 100 ml aquades steril ke dalam Erlenmeyer sampai larutan bening, lalu diberi label untuk selanjutnya disimpan di dalam lemari pendingin. Untuk pembuatan larutan stok BAP dilakukan dengan penimbangan bahan sebanyak 100 mg dan dituangkan ke dalam erlenmeyer yang diberi HCl 1 N secara perlahan-lahan, kemudian aduk menggunakan batang pengaduk sampai benar-benar homogen. Selanjutnya ditambahkan 100 ml aquades steril ke dalam Erlenmeyer, lalu diberi label untuk selanjutnya disimpan di dalam lemari pendingin. Untuk memperoleh konsentrasi masing-masing hormone 2,4-D dan BAP 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 aduk menggunakan batang pengaduk sampai benar-benar homogen, selanjutnya media yang telah bercampur dimasak hingga medium mendidih. 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. .

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

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 BAP dibagi juga menjadi 4 bagian, sehingga menjadi 250 ml. Untuk konsentrasi 0 ppm BAP (B₀), tidak ada penambahan hormon BAP. Konsentrasi 1 ppm BAP (B₁), Medium MS ditambahkan 1 ppm BAP (0,25 ml larutan stok BAP). Konsentrasi 2 ppm BAP (B₂), Medium MS ditambahkan 2 ppm BAP (0,5 ml larutan stok BAP). Konsentrasi 3 ppm BAP(A₃), Medium MS ditambahkan 3 ppm BAP (0,75 ml larutan stok BAP). 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 + BAP

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

2,4-D BAP	1 ppm	2 ppm	3 ppm
1 ppm	1 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	2 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP	3 ppm 2,4-D + 1 ppm BAP
2 ppm	1 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP	2 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP	3 ppm 2,4-D + 2 ppm BAP
3 ppm	1 ppm 2,4-D + 3 ppm BAP	2 ppm 2,4-D + 3 ppm BAP	3 ppm 2,4-D + 3 ppm BAP

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 pembuatan medium MS + 2,4-D + BAP, maka dilakukan penambahan medium MS dengan berbagai konsentrasi 2,4-D + BAP (Tabel. 2). Selanjutnya diaduk menggunakan batang pengaduk sampai benar-benar homogen. Kemudian media yang telah bercampur dimasak hingga medium mendidih. Setelah itu dituangkan ke dalam botol yang telah disiapkan dengan takaran 250 ml untuk 8-10 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 BAP dengan posisi daun terlungkup, setiap botol kultur terdiri dari satu eksplan. Setelah itu botol kultur ditutup

kembali dengan *plastic sampel* dan di *cling wrap*. Selanjutnya disimpan di ruang inkubasi dengan suhu ± 25 °C dengan kelembaban relative 60% selama 2 bulan.

III.7 Pemeliharaan Eksplan

Penyemprotan botol-botol kultur yang berisi eksplan yang diletakkan di rak kultur pada ruang gelap dengan temperatur ± 25 °C dilakukan setiap hari dengan menggunakan alkohol 70%. 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 kecoklatan dan coklat.

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 struktur kompak (permukaan kalus mengkilap dan seluruh permukaan rata) dan struktur 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.9 Analisis Data

Data pengamatan berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa pengamatan secara visual meliputi morfologi kalus (warna dan tekstur), sedangkan data kuantitatif berupa berat basah kalus dan waktu muncul 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%.