

**PRODUKSI KAFEIN NON SINTETIK DENGAN PENAMBAHAN
L-METIONIN MELALUI TEKNOLOGI KULTUR JARINGAN KALUS
KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L. ASAL TORAJA**

SYIANTO TRI PUTRA ALAM MULYOTO

H411 16 020



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

**PRODUKSI KAFEIN NON SINTETIK DENGAN PENAMBAHAN
L-METIONIN MELALUI TEKNOLOGI KULTUR JARINGAN KALUS
KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L. ASAL TORAJA**

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Sains pada Departemen Biologi

Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Hasanuddin

SYIANTO TRI PUTRA ALAM MULYOTO

H411 16 020

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

HALAMAN PENGESAHAN

**PRODUKSI KAFEIN NON SINTETIK DENGAN PENAMBAHAN
L-METIONIN MELALUI TEKNOLOGI KULTUR JARINGAN KALUS
KOPI ROBUSTA *Coffea canephora* L. ASAL TORAJA**

Disusun dan diajukan oleh:

**SYIANTO TRI PUTRA ALAM MULYOTO
H411 16 020**

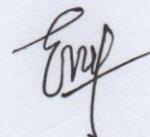
Disetujui oleh

Pembimbing Utama



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

Pembimbing Pertama



Dr. Eva Johannes, M.Si
NIP. 196102171986012001

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan *Alhamdulillah* segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah SAW yang telah membawa manusia dari alam biadab menuju alam yang beradab seperti sekarang ini.

Skripsi dengan judul **“Produksi Kafein Non Sintetik Dengan Penambahan L-Metionin Melalui Teknologi Kultur Jaringan Kalus Kopi Robusta *Coffea canephora* L. Asal Toraja”** disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini.

Penelitian dan penulisan skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik karena dukungan dan doa dari berbagai pihak dan orang-orang yang terkasih. Pada kesempatan ini, penulis memberikan penghargaan yang setinggi-tingginya dan ribuan ucapan terima kasih kepada keluarga terkhususnya kepada kedua orang tua penulis, Ibunda tercinta Rugayati dan Ayahanda tercinta Mulyoto yang senantiasa setulus hati memberikan doa, kasih sayang, semangat dan dukungan penuh yang besar kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan studi ini. Kemudian kedua kakak penulis Muh. Masum Mulyoto dan Siti Wahyuni Mulyoto yang turut

mendukung penuh, memberi semangat, dan memberi saran penulis untuk menyelesaikan studi ini.

Terima kasih penulis ucapkan yang sebesar-besarnya kepada Bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si selaku pembimbing utama yang telah penulis anggap sebagai orang tua kedua di kampus, yang telah banyak meluangkan waktu, memberikan dukungan, memberikan saran-saran positif, memberikan bimbingan, motivasi dan pengetahuan yang berharga kepada penulis baik dalam penyusunan skripsi ini maupun kehidupan akademik. Dalam proses penelitian skripsi penulis sadar banyak mendapatkan halangan dan hambatan, terima kasih karena Pak Andi selalu memberikan saran berupa solusi agar skripsi ini dapat selesai dengan baik. Terima Kasih pula yang sebesar-besarnya penulis ucapkan kepada ibu Dr. Eva Johannes, M.Si selaku pembimbing pertama yang senantiasa tak jenuh membimbing, memberi dukungan, memberi motivasi dan memberikan masukan yang membangun selama tahap penelitian penyusunan skripsi ini.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu M.A selaku rektor Universitas Hasanuddin.
2. Dr. Eng Amiruddin, M.Si. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
3. Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si. selaku Ketua Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
4. Drs. Muhtadin Asnady Salam, M.Si. selaku penasehat akademik sekaligus penguji sidang sarjana. Terima kasih atas saran dan bimbingan, serta segala perhatian dalam perkembangan akademik penulis.

5. Dr. Markarma, M.Si. selaku penguji sidang sarjana yang telah memberikan kritik dan saran positif demi kemajuan skripsi ini.
6. Kepada seluruh dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Serta staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.
7. Ibu Darni selaku Kepala Laboratorium Kultur Jaringan UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Provinsi Sulawesi Selatan Kabupaten Gowa. Terima kasih telah sabar mengajarkan ilmu-ilmu dalam praktik kultur jaringan, dan meluangkan waktu untuk bertukar ide dalam tahap penelitian skripsi penulis. Kemudian Pak Mansyur sebagai laboran kultur jaringan yang senantiasa mendampingi kami dan menemani kami mengerjakan penelitian.
8. Kepada Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, terkhusus kepada teman-teman asisten Laboratorium sekaligus teman seperjuangan dalam penelitian Kultur Jaringan Tanaman. Ada Fatimah, Deka, Fahrani, dan juga ada Aulia dan Wiwik teman seperjuangan di tempat Magang. Terima Kasih banyak atas dukungan dan kerjasamanya.
9. Kepada Hasmawati, terima kasih atas dukungan dan perhatiannya dari mahasiswa baru sampai mahasiswa tua dan semoga seterusnya.
10. Kepada Sahabat sekampung Toni, Jabbar, Ibe, Anja, Kadri, Farlih, dan Fadil yang masih menemani dan tetap memberikan dukungan hingga saat ini.

11. Kepada kanda-kanda Himbio FMIPA Unhas, terkhusus Kak Aci yang senantiasa memberikan support, dukungan, dan motivasi selama kehidupan berkampus.
12. Kepada Teman-teman terbaik sekampus Wisnu, Maman, Bangmed, Yusuf, Herman, Fila, Rena, Sony yang hingga saat ini masih menemani dan memberikan dukungan positif.
13. Kepada adik-adik group gosip Ardi dan Fatir yang selalu ada untuk menemani disaat suka dan duka.
14. Kepada teman-teman posko KKN Gel. 103 khususnya KKN Desa Lantang, Kecamatan Polongbangkeng Selatan. Muja, Mail, Elma, Tia, Naya yang memberikan dukungan, serta teman sekecamatan Polsel.
15. Kepada Angkatan Biologi 2016 (Biodiversity), Terima kasih atas kenangan yang terukir selama kurang dari 4 tahun, dan saling membantu dalam suka dan duka.
16. Kepada saudara-saudariku Pengurus BEM FMIPA Unhas Periode 2019/2020, yang telah memberikan dukungan dan berbahagia dalam situasi apapun.

Dengan ini saya mengucapkan terima kasih banyak untuk semua pihak yang terlibat, baik yang telah disebutkan maupun yang tidak disebutkan. Semoga kedepannya skripsi ini dapat berguna sebagai referensi tambahan bagi banyak orang.

Makassar, 5 Agustus 2020

Penulis

ABSTRAK

Kafein merupakan senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid purin yang dihasilkan oleh beberapa tanaman seperti kopi. Diantara spesies tanaman kopi, kopi robusta atau *Coffea canephora* L. merupakan spesies dengan kadar kafein tertinggi. Biosintesis kafein difasilitasi oleh siklus *S-adenosyl-L-methionine* (SAM) melalui proses metilasi dimana L-Metionin berperan sebagai precursor metilasi pada jalur biosintesis kafein. Penelitian ini bertujuan untuk memproduksi kafein dengan penambahan L-Metionin serta untuk mengetahui konsentrasi optimal penambahan L-Metionin terhadap produksi kafein kopi robusta *Coffea canephora* L. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Gowa, Laboratorium Kultur Jaringan Biologi FMIPA Unhas, serta Laboratorium Biokimia FMIPA Unhas, Makassar. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 1 faktorial yaitu penambahan L-Metionin dengan 6 konsentrasi yaitu 0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L. Media eksplan kopi robusta *Coffea canephora* L. terdiri atas *Murahige-Skoog* (MS) + 2,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin (MS+ZPT) dan L-Metionin dengan berbagai konsentrasi. Tiap perlakuan diulang sebanyak 5 kali. Data dianalisis dengan Analysis of Variance (ANOVA) dan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan A0B25 25 mg/L L-Metionin memiliki persentase produksi kafein tertinggi sebesar 0,0422% serta berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Morfologi kalus yaitu memiliki tekstur remah serta warna sedikit kekuningan dari perlakuan penambahan L-Metionin. Sedangkan persentase eksplan membentuk kalus dengan hasil yaitu tidak memberikan pengaruh nyata.

Kata Kunci: Kopi robusta *Coffea canephora* L., L-Metionin, produksi kafein, *S-adenosyl-L-methionine* (SAM), kultur kalus.

ABSTRACT

Caffeine is a secondary metabolite compound group from purine alkaloids, which is synthesized by several plants such as coffee. Among the coffee plant species, Robusta coffee is the species with the highest caffeine content. The caffeine biosynthesis is facilitated by the *S-adenosyl-L-methionine* (SAM) cycle through a methylation process where L-Methionine acts as a methylation precursor in the caffeine biosynthesis pathway. This study aims to produce caffeine with the addition of L-Methionine and to determine the optimal concentration of L-Methionine addition to Robusta coffee *Coffea canephora* L. production. This study has been done in Plant Tissue Culture Laboratory of the UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Gowa, Biology Tissue Culture Laboratory of FMIPA Unhas, and Biochemistry Laboratory of FMIPA Unhas, Makassar. The experiment was carried out using a completely randomized design with 1 factorial that is L-Methionine with 6 concentrations level that is 0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L. The explants of Robusta Coffee *Coffea robusta* L. media consist of *Murashige-Skoog* (MS) + 2,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin (MS+ZPT) + L-Methionine at various concentrations. Each L-Methionine treatment was repeated 5 times. Data were analyzed by *Analysis of Variance* (ANOVA) and further test *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) at 5% level. The result shows that the A0B25 25 mg/L L-Methionine treatment has the highest percentage of caffeine production is 0,0422% and has significantly different result from the other treatments. The callus morphology has friable texture and slightly yellowish color from the L-Methionine addition treatment. While the percentage of explants that formed callus has no significant effect .

Keywords: Robusta coffee *Coffea canephora* L., L-Methionine, caffeine production, *S-adenosyl-L-methionine* (SAM), callus 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	4
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
II.1 Kopi <i>Coffea sp.</i>	6
II.1.1 Kopi Robusta <i>Coffea canephora L.</i>	7
II.2. Kafein.....	9
II.2.1 Biosintesis Kafein	11
II.2.2 Siklus S-adenosyl-L-methionine (SAM).....	12
II.3 Teknologi Kultur Jaringan.....	13
II.3.1 Kultur Jaringan Kalus.....	14
II.3.2 Zat Pengatur Tumbuh.....	17

BAB III METODE PENELITIAN	20
III.1 Alat dan Bahan.....	20
III.1.1 Alat.....	20
III.1.2 Bahan.....	20
III.2 Rancangan Penelitian	20
III.3 Prosedur Penelitian	21
III.3.1 Sterilisasi.....	21
III.3.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	21
III.3.1.2 Sterilisasi Sampel	21
III.3.1.3 Sterilisasi Ruang Kerja.....	22
III.3.2 Pembuatan Larutan	22
III.3.2.1 Pembuatan Larutan Stok L-Metionin.....	22
III.3.2.2 Pembuatan Media MS + Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). 22	
III.3.2.3 Pembuatan Media MS + ZPT + L-Metionin.....	22
III.3.3 Penanaman Eksplan.....	23
III.3.4 Pemeliharaan Kalus.....	23
III.4 Parameter Pengamatan.....	24
III.4.1 Tahap Pengamatan.....	24
III.4.2 Parameter Pengamatan Kalus.....	24
III.4.3 Pengamatan Kandungan Metabolit Sekunder Kafein.....	25
III.4.3.1 Pembuatan Ekstrak Kafein Kalus.....	25
III.4.3.2 Uji Kualitatif dengan Metode Parry.....	25
III.4.3.3 Metode Spektrofotometri UV-Vis.....	25
III.4.3.3.1 Pembuatan Larutan Baku Kafein.....	26

III.4.3.3.2 Pembuatan Kurva Standar.....	26
III.4.3.3.3 Uji Kandungan Kafein Kalus.....	26
III.4 Analisis Data.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
IV.1 Kadar Kafein Kultur Kalus Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.....	27
IV.1.1 Uji Kualitatif Kafein.....	27
IV.1.2 Uji Kuantitatif Kadar Kafein.....	28
IV.2 Persentase Eksplan Membentuk Kalus.....	32
IV.3 Tekstur dan Warna Kalus.....	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	38
V.1 Kesimpulan.....	38
V.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA.....	39
LAMPIRAN.....	42

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Pembuatan MS + ZPT + L-Metionin.....	22
Tabel 2. Tekstur Kualitatif dengan Reagen Parry.....	27
Tabel 3. Hasil Analisis Kuantitatif Metode Spektrofotometri UV-Vis.....	29
Tabel 4. Uji DMRT 5% Pemberian L-Metionin terhadap Produksi Kafein.....	30
Tabel 5. Tekstur Kalus Setelah 77 HST Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L....	35
Tabel 6. Warna Kalus Setelah 77 HST Kopi Robusta <i>Coffea canephora</i> L.....	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Morfologi Kopi Robusta.....	8
Gambar 2. Struktur Kafein.....	9
Gambar 3. Biosintesis Kafein.....	11
Gambar 4. Siklus SAM serta biosintesis kafein dengan prekursor Metionin.....	13
Gambar 5. Kalus kopi robusta dilihat secara makroskopis (A) dan mikroskopis (B).....	16
Gambar 6. Kurva regresi linear baku kafein.....	28
Gambar 7. Persentase kadar kafein tiap perlakuan pemberian L-Metionin	30
Gambar 8. Grafik rata-rata eksplan kopi robusta <i>Coffea canephora</i> L membentuk kalus 77 HST.....	33
Gambar 9. Kalus embriogenesis somatik.....	34
Gambar 10. Tekstur kalus remah kopi robusta 77 HST (a) perlakuan tanpa L-Metionin kontrol (b) perlakuan L-Metionin 10 ppm.....	36
Gambar 11. Warna kalus kopi robusta 77 HST (a) perlakuan tanpa L-Metionin kontrol (b) perlakuan L-Metionin 20 ppm.....	37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi Media Murashige and Skoog (MS)	42
Lampiran 2.	Pembuatan Larutan stok L-Metionin.....	42
Lampiran 3.	Perhitungan Pengambilan L-Metionin dalam Larutan Stok.....	42
Lampiran 4.	Pembuatan Larutan Baku Kafein.....	43
Lampiran 5.	Perhitungan Spektrofotometri UV-Vis.....	44
Lampiran 6.	Skema Kerja.....	46
Lampiran 7.	Foto Pembuatan Media Perlakuan.....	47
Lampiran 8.	Foto Sterilisasi dan Penanaman Eksplan.....	48
Lampiran 9.	Foto Pengamatan.....	49
Lampiran 10.	Foto Hasil Pengamatan Kalus.....	50
Lampiran 11.	Foto Ekstraksi.....	52
Lampiran 12.	Foto Uji Kualitatif Metode Parry.....	54
Lampiran 13.	Foto Metode Spektrofotometri UV-Vis.....	55
Lampiran 14.	Data Hasil Uji Spektrofotometri UV-Vis.....	56
Lampiran 15.	Hasil Uji Anova dan Uji lanjut DMRT 5% Pemberian L-Metionin terhadap Produksi Kafein.....	58
Lampiran 16.	Data Hasil Pengamatan Persentase Eksplan Membentuk Kalus.....	58
Lampiran 17.	Hasil Uji ANOVA Persentase Eksplan Membentuk Kalus.....	59
Lampiran 18.	Tabel Massa Akhir Kalus.....	59

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kopi merupakan komoditi perkebunan yang masuk dalam kategori komoditi strategis di Indonesia. Indonesia adalah produsen kopi terbesar ketiga di dunia setelah Brazil dan Vietnam dengan menyumbang sekitar 6% dari produksi total kopi dunia (Nugrawati dan Muhammad, 2018). Menurut Gumulya dan Ivana (2017), Kopi bukan merupakan tanaman asli kepulauan Indonesia. Pada akhir abad ke 16 VOC membawa tanaman kopi Arabika ke Negara Indonesia yang kemudian menjadi perkebunan kopi di beberapa daerah. Mendekati akhir abad ke 19, perkebunan kopi di Indonesia terserang hama kopi yang meluluhlantakkan industri pemerintah kolonial Belanda. Akhirnya di impor bibit kopi Liberika, tetapi ini tidak bertahan lama karena terinfeksi hama yang sama. Kemudian Belanda menanam varietas baru kopi robusta yang lebih kuat terhadap hama. Hingga kini Robusta menempati sekitar 90% produksi kopi Nasional. Ada tiga daerah utama di Indonesia yang menghasilkan kopi; Jawa, Sumatera, dan Sulawesi.

Daerah penanaman kopi paling terkenal di Sulawesi adalah Toraja. Toraja terkenal sebagai salah daerah destinasi wisata di Indonesia. Selain menawarkan wisata alam dan budaya, daerah ini juga menawarkan wisata kulinernya. Salah satu yang paling digemari dan terkenal dari Toraja adalah kopinya. Kopi Toraja mengandung kadar kafein cukup tinggi dan kadar asam yang tergolong rendah sehingga mendapat apresiasi tersendiri dari para penikmat dan pecinta kopi (Marampa dan Lusiawati, 2016).

Kopi mempunyai banyak kandungan yang berguna untuk tubuh. Senyawa aktif dari bahan alami yang terkandung dalam kopi adalah polifenol dan alkaloid. Adapun senyawa alkaloid dalam kopi adalah kafein (Citradewi, dkk., 2018). Kafein merupakan senyawa alkaloid xantin berbentuk kristal dan berasa pahit yang bekerja sebagai obat perangsang psikoaktif dan diuretik ringan (Marampa dan Lusiawati, 2016).

Kafein memiliki beberapa khasiat antara lain merupakan obat analgetik yang mampu menurunkan rasa sakit dan mengurangi demam. Selain itu, kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan saraf pusat, relaksasi otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung (Isnidar, dkk., 2016). Kadar kafein pada jenis kopi sangat bermacam-macam. Kopi Robusta memiliki kafein tertinggi yaitu 2.26g/100g, diikuti dengan kopi Arabica dengan kafein 1.61 g/100g. kemudian kafein terendah pada kopi Liberica yaitu 1.23 g/100g (Ling, dkk., 2010).

Salah satu teknik untuk meningkatkan kandungan senyawa kafein adalah memproduksinya secara *in vitro*. Kelebihan produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* antara lain adalah faktor lingkungan kultur dapat diatur dan dikendalikan sehingga tidak dipengaruhi oleh iklim, hama, penyakit, musim, dan areal penanaman sehingga kualitas produksi lebih konsisten serta hasil metabolit sekunder yang akan diperoleh dapat lebih tinggi dari tanaman induknya. (Syahid, dkk., 2010). Hal ini tentu merupakan inovasi yang efisien untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder dalam waktu yang relatif singkat, diproduksi tidak terbatas, dan produksi senyawa yang lebih banyak. Produksi metabolit sekunder melalui kultur *in vitro* dapat dilakukan melalui kultur kalus.

Melalui teknologi kultur jaringan, metabolit sekunder yang dihasilkan dalam jaringan tanaman utuh dapat dihasilkan juga dalam sel-sel yang dipelihara pada medium buatan secara aseptik. Pemanfaatan teknik kultur jaringan tanaman dengan kultur kalus adalah salah satu cara untuk menghasilkan senyawa metabolisme sekunder (Purnmaningsih dan Misky, 2011). Menurut Laila dan Evika (2014), kultur kalus juga menjadi suatu alternatif untuk meningkatkan sintesa metabolit sekunder yang mempunyai nilai komersial tinggi.

Induksi kalus memerlukan pasokan zat pengatur tumbuh secara eksogen yaitu auksin dan sitokinin yang dapat digunakan secara tunggal ataupun kombinasi keduanya dengan konsentrasi yang tepat. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang umum digunakan untuk induksi kalus Aplikasi 2,4-D yang dikombinasikan dengan sitokinin (BA atau kinetin) akan lebih meningkatkan pertumbuhan kalus (Syahid, dkk., 2010).

Kafein memiliki jalur biosintesis yang melibatkan L-metionin sebagai gugus prekursor metilasi. Jalur biosintesis kafein melibatkan tiga tahap metilasi dan satu reaksi nukleosidase. Jalur utama pada biosintesis kafein bermula dengan konversi Xantosine menjadi *7-Methylxanthine* dengan peran *S-Adenosyl-l-Methionine* (SAM) sebagai donor metil. Reaksi nukleosidase berlangsung melepas ribose, selanjutnya SAM berperan sebagai donor metil untuk mengkonversinya menjadi theobromine kemudian kafein. Setiap tahap metilasi, SAM akan menjadi *S-Adenosyl-l-Homocysteine* (SAH) sebagai produk dari siklus SAM. SAH kemudian terhidrolisis sehingga memproduksi L-homosistein dimana akan dimanfaatkan kembali pada sintesis SAM melalui gugus Metionin sehingga siklus ini akan berulang membentuk SAM kembali (Koshiish *et all.*, 2011). Dalam hal ini, penambahan gugus metionin akan menambah produksi kafein dimana

bertindak sebagai prekursor metilasi. Hal ini sesuai dengan penelitian Latunra (2004), bahwa pada kultur kalus tanaman kopi arabika (*Coffea arabica* L.) dengan penambahan L-metionin nyata meningkatkan kadar kafein seiring dengan pertumbuhan kalus.

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, penambahan L-metionin mampu menambah produktivitas kafein pada kultur jaringan kalus kopi arabica. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk memproduksi kafein secara *in vitro* dengan penambahan L-metionin pada kultur jaringan kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. asal Toraja.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yaitu:

1. Untuk memproduksi kafein dari kalus kopi robusta *Coffea canephora* L. secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui konsentrasi optimal dengan penambahan L-metionin terhadap produksi kafein pada kultur jaringan kalus kopi robusta *Coffea canephora* L.

I. 3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai konsentrasi tepat penambahan L-metionin terhadap produksi kafein dari kultur kalus kopi Robusta *Coffea canephora* L. serta menjadi inovasi produksi kafein secara *in vitro* melalui teknologi kultur jaringan sehingga diharapkan dapat dimanfaatkan dibidang industri.

I. 4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai bulan Juni 2020. Pengambilan sampel dilakukan di Daerah Toraja, Sulawesi Selatan. Penelitian ini dilakukan di tiga tempat yaitu sebagai berikut:

1. Penelitian Kultur Jaringan Kalus dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Bonto-Bonto, UPT Balai Benih Tanaman dan Hortikultura, Gowa.
2. Pengamatan lanjutan Kultur Kalus dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.
3. Analisis senyawa kafein dilakukan di Laboratorium Biokimia Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kopi *Coffea sp.*

Kopi merupakan salah satu tanaman perkebunan yang memiliki ekonomis tinggi dan sudah lama dibudidayakan. Nama kopi berasal dari nama kota Kaffa di tenggara Ethiopia, di mana kopi pertama kali ditemukan. Ada sejarah lain yang menyatakan kata kopi berasal dari kata “kuvvah” yang berarti “kekuatan”, karena kopi dikenal dapat mencegah kantuk. Tanaman kopi merupakan spesies tanaman pohon berkayu yang termasuk dalam family *Rubiaceae* dan genus *Coffea* (Rahmawati, 2018).

Kopi merupakan biji-bijian dari pohon jenis *coffea*. Satu pohon kopi dapat menghasilkan sekitar satu kilogram kopi pertahun. Ada lebih dari 25 jenis kopi dengan 3 jenis utama yang paling terkenal adalah robusta, liberika, dan arabica, yang mewakili 70 persen dari total produksi. Kopi menjadi salah satu minuman paling populer dan digemari di seluruh dunia. Saat ini kopi merupakan komoditas nomor dua yang paling banyak diperdagangkan setelah minyak bumi. Salah satu kopi yang sering dikonsumsi oleh masyarakat yaitu kopi arabika karena cenderung menimbulkan aroma *fruity* sebab adanya senyawa aldehid, asetaldehida, dan propanal. Kadar kafein biji mentah kopi arabika lebih rendah dibandingkan biji mentah kopi robusta, kandungan kafein kopi Arabika sekitar 1,2 % (Zarwinda dan Dewi, 2018).

Indonesia termasuk salah satu Negara penghasil dan pengekspor kopi karena kondisi lahan dan iklim Indonesia cocok untuk budidaya kopi. Ada tiga spesies kopi yang dibudidayakan di Indonesia yaitu kopi arabika (*Coffea arabika*),

kopi liberika (*Coffea liberica*), dan kopi robusta (*Coffea canephora*). Kopi robusta adalah tanaman kopi yang paling tahan terhadap serangan penyakit sehingga banyak ditanam di dunia. (Citradewi, dkk., 2018).

II.1.1 Kopi Robusta *Coffea canephora*

Kopi Robusta (*Coffea canephora*) merupakan salah satu jenis kopi yang memiliki nilai strategis dalam rangka memberdayakan ekonomi rakyat. Sebagian besar produksi dan ekspor kopi Indonesia didominasi oleh jenis kopi ini, dengan jumlah tanaman yang dibudidayakan mencapai 90%. Tidak mengherankan jika kebutuhan terhadap benih kopi Robusta klon unggul terus berlangsung (Ibrahim dan Sri, 2017).

Berikut Klasifikasi Kopi robusta menurut ITIS (2011):

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Viridiplantae
Superdivisio : Embryophyta
Divisio : Tracheophyta
Subdivisio : Spermatophytina
Classis : Magnoliopsida
Superordo : Asteranae
Ordo : Gentianales
Familia : Rubiaceae
Genus : *Coffea*
Species : *Coffea canephora* L.

Karakter morfologi yang khas pada kopi robusta adalah tajuk yang lebar, perwatakan besar, ukuran daun yang lebih besar dibandingkan daun kopi arabika, dan memiliki bentuk pangkal tumpul. Selain itu, daunnya tumbuh berhadapan

dengan batang, cabang, dan ranting-rantingnya (Najiyatih dan Danarti 2012). Biji kopi robusta juga memiliki karakteristik yang membedakan dengan biji kopi lainnya. Secara umum, biji kopi robusta memiliki rendemen yang lebih tinggi dibandingkan kopi arabika. Selain itu, karakteristik yang menonjol yaitu bijinya yang agak bulat, lengkungan bijinya yang lebih tebal dibandingkan kopi arabika, dan garis tengah dari atas ke bawah hampir rata (Panggabean 2011).



Gambar 1. Morfologi Kopi Robusta
Sumber: Bibitkopi.com

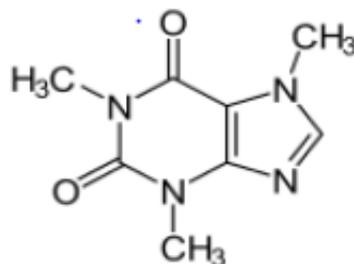
Kopi Robusta termasuk tanaman menyerbuk silang sehingga harus diperbanyak secara vegetatif untuk menjamin mutu genetik benih yang dihasilkan sama dengan induknya. Perbanyak vegetatif menggunakan teknik setek dibatasi oleh terbatasnya produksi tunas air (entres) dan jumlah ruas cabang yang dapat digunakan. 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 serta lebih rentan terhadap kekeringan (Ibrahim dan Sri, 2017).

Komponen kimiawi yang teridentifikasi pada tanaman kopi seperti kafein, serat, trigonelin, dan diterpenoid dari fraksi lipid. Komponen fenolik lain seperti lignin dan antosianin juga teridentifikasi. Terdapat pula mineral-mineral seperti

magnesium, potassium, tembaga, kalsium, aluminium, dan fosfor. Proses biologis pada kopi terutama pada terpenoid, alkaloid dan senyawa fenolik. Dua tipe alkaloid pada biji kopi adalah kafein (1,3,7 trimetilxantin) dan trigonelin (Stefanello *et all.*, 2018).

II.2 Kafein

Kafein (1,3,7-*N*-trimethylxanthine) adalah salah satu senyawa nitrogen penting dengan kadar molekular rendah pada tanaman kopi. Kafein merupakan alkaloid purin dan disintesis dari nukleotida purin pada beberapa tanaman, termasuk tanaman teh, tanaman mate dan tanaman kopi (Stefanello *et all.*, 2018). Kafein (C₈H₁₀N₄O₂) atau 1,3,7 trimetil 2,6 dioksipurin merupakan salah satu senyawa alkaloid yang sangat penting yang terdapat dalam biji kopi. Kadar kafein dalam minuman kopi sangat bermacam-macam. Telah dilaporkan bahwa konsentrasi kafein dalam kopi berkafein berkisar 29-130 mg/cup (240 ml) (Citradewi, dkk., 2018).



Gambar 2. Struktur Kafein.
Sumber: Zarwinda dan Dewi, 2018

Kafein merupakan suatu senyawa golongan alkaloid xantin dan dipercaya oleh sebagian besar orang untuk melawan rasa kantuk. Zat ini dapat ditemukan pada berbagai tumbuhan ataupun buah-buahan, coklat, kopi, dan teh. Kopi salah satu tumbuhan yang mengandung kafein. Penyusun utamanya adalah senyawa

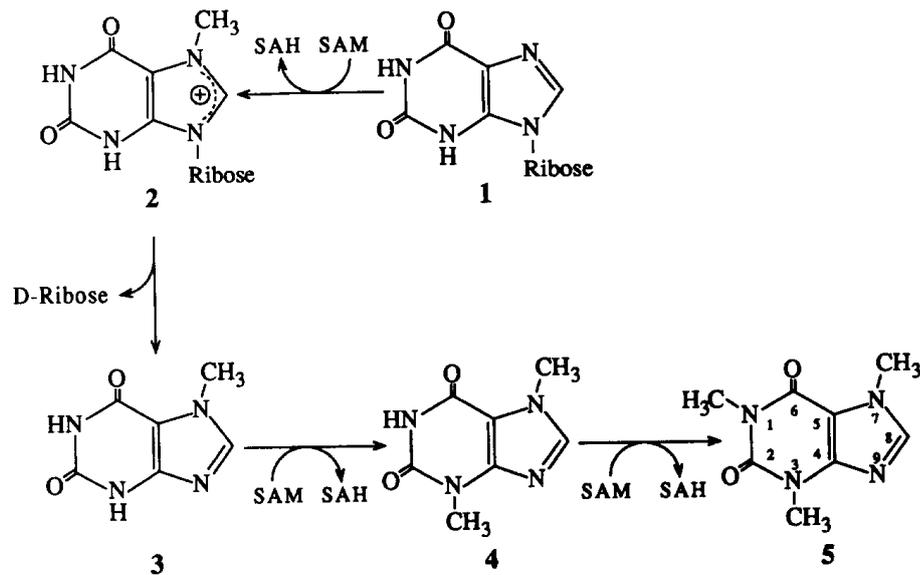
turunan protein disebut dengan purin xantin. Senyawa ini pada kondisi tubuh yang normal memang memiliki beberapa khasiat antara lain merupakan obat analgetik yang mampu menurunkan rasa sakit dan mengurangi demam. Kafein memiliki manfaat seperti menstimulasi susunan saraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung. Efek berlebihan mengkonsumsi kafein dapat menyebabkan gugup, gelisah, tremor, insomnia, hipertensi, mual dan kejang (Zarwinda dan Dewi, 2018).

Kafein merupakan suatu senyawa berbentuk kristal. Penyusun utamanya adalah senyawa turunan protein disebut dengan purin xantin. Senyawa ini pada kondisi tubuh yang normal memang memiliki beberapa khasiat antara lain merupakan obat analgetik yang mampu menurunkan rasa sakit dan mengurangi demam. Akan tetapi, pada tubuh yang mempunyai masalah dengan keberadaan hormon metabolisme asam urat, maka kandungan kafein dalam tubuh akan memicu terbentuknya asam urat tinggi (Arwangga, dkk., 2016).

Kandungan kafein pada kopi selain memberikan dampak negatif terhadap manusia, juga memberikan dampak positif yaitu kopi dimanfaatkan sebagai peningkat kapasitas kerja paru-paru pada penderita *asmabronkial*. Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis, seperti menstimulasi susunan syaraf pusat, relaksasi otot polos terutama otot polos bronkus dan stimulasi otot jantung (Arwangga, dkk., 2016). Menurut Aprilia dkk (2018), kafein dapat menghilangkan rasa letih, lapar dan mengantuk, juga meningkatkan daya konsentrasi dan memperkuat kontraksi jantung. Karena efek farmakologis inilah seringkali kafein ditambahkan pada minuman-minuman berenergi dalam kemasan.

II.2.1 Biosintesis Kafein

Biosintesis kafein dimulai dengan metilasi pertama pada xantosin (1) menghasilkan 7-metilxantosin (2). Setelah *de-ribosylation* akan menghasilkan 7-metilxantoin (3) dimana selanjutnya melalui proses metilasi untuk membentuk theobromin (4) dan metilasi kembali sehingga membentuk kafein (5) dengan *S-adenosyl-L-methionine* (SAM) sebagai sumber dari tiga gugus metil tersebut. Metionin merupakan gugus efisien prekursor pada biosintesis kafein (Jin *et al.*, 2016). Menurut Mohanan *et al.* (2013), Metionin *synthase* adalah enzim yang penting pada siklus metionin untuk regenerasi SAM dimana SAM berperan sebagai pendonor metil.



Gambar 3. Biosintesis Kafein
Sumber: Schulthess dan Thomas, 1994

Selain jalur biosintesis kafein memiliki tahap metilasi melalui siklus *S-adenosyl-L-methionine* (SAM) dan tahap nukleosidase pelepasan ribose, N-Metiltransferase juga memiliki peran penting dalam sintesis kafein. N-Metiltransferase adalah enzim dalam reaksi transfer metil yang dikodekan oleh gen tertentu (Mohanan *et al.*, 2013). Terdapat 3 jenis N-Metiltransferase yang

ditemukan dalam gen tanaman kopi yaitu *7-methylxanthosine synthetase*, *theobromine synthase* dan *caffeine synthase*. Enzim pertama (*methylxanthosine synthetase*) dan kedua (*theobromine synthase*) mengkatalisis metiltransferasi tahap pertama dan kedua pada biosintesis kafein, sedangkan enzim terakhir (*caffeine synthase*) dapat mengkatalisis tahap kedua dan ketiga (terakhir) dari biosintesis kafein (Kumar dan Parvatam, 2015).

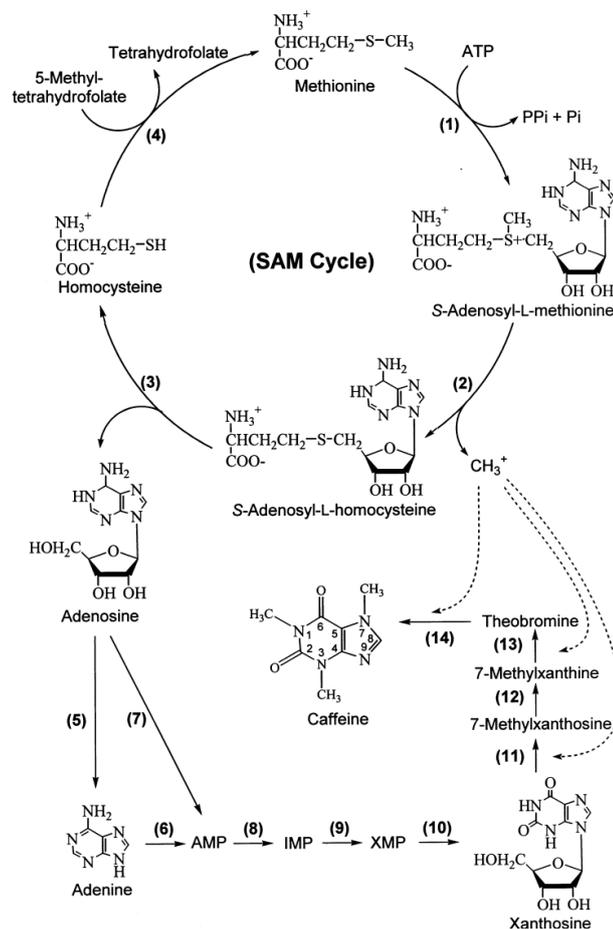
II.2.2 Siklus S-adenosyl-L-methionine (SAM)

Sel makhluk hidup sebagian besar terdiri dari protein, dan hanya 20 asam amino penting saja yang terlibat dalam proses penyusunan protein, salah satu diantaranya ialah L-metionin. Telah dipahami bersama bahwa makhluk hidup akan mempertahankan kehidupannya dengan mensintesis protein yang dibutuhkan oleh sel tubuhnya dengan mengambil unsur atau zat lain yang dibutuhkan dari lingkungannya. Metionin adalah salah satu asam amino esensial yang berperan dalam donor group metil (Tyunina *et al.*, 2019).

Metionin berasal dari tiga jalur memusat yaitu: karbon yang merupakan keturunan dari asam aspartate, atom sulfur dari sistein, dan kelompok metil dari β -karbon serin. Asam amino ini mempunyai peran tambahan seperti sebuah rintangan blok untuk sintesis protein. Hal ini karena metionin adalah prekursor dari S-adenosil metionin, yang memainkan banyak peran pada kelompok donor utama pada reaksi transmetilasi, biosintesis poliamin lanjutan, fitohormon etilen, dan lain lain (Ariantika, 2018).

Metionin merupakan gugus sumber metil pada proses biosintesis kafein yang diaktivasi oleh ATP sehingga menjadi *S-adenosyl-L-methionine* (SAM), sebagai pendonor metil primer pada reaksi metil transferase. SAM akan

membentuk SAH *S-adenosyl-L-homocysteine* setelah memberikan gugus metil pada aseptor molekul. SAH kemudian disingkirkan melalui SAH hidrolase karena menghambat N-Metiltransferasi hingga menjadi adenosine dan homosistein (Shawky *et al.*, 2017). L-Metionin berperan sebagai gugus yang akan melengkapi kembali siklus SAM sehingga terjadi kesinambungan. Siklus ini akan terus berulang dengan korelasi N-Metiltransferase pada biosintesis kafein (Koshiishi *et al.*, 2011).



Gambar 4. Siklus SAM serta biosintesis kafein dengan prekursor Metionin
Sumber: Koshiishi *et al.*, 2011

II.3 Teknologi Kultur Jaringan

Kultur jaringan merupakan salah satu teknik dalam memperbanyak tanaman secara klonal untuk memperbanyak massal. Keuntungan pengadaan bibit melalui

kultur jaringan antara lain dapat diperoleh bahan tanaman yang unggul dalam jumlah banyak dan seragam, selain itu dapat diperoleh biakan steril (*mother stock*) sehingga dapat digunakan sebagai bahan untuk perbanyakannya selanjutnya. Untuk mendapatkan hasil yang optimum maka penggunaan media dasar dan zat pengatur tumbuh yang tepat merupakan faktor yang penting (Lestari, 2011).

Kultur jaringan tanaman adalah metode atau teknik mengisolasi jaringan, organ, sel maupun protoplas tanaman yang sering disebut eksplan didalam media yang *aseptic* sehingga dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh seperti induknya. Di bidang farmasi, teknik kultur jaringan sangat menguntungkan karena dapat mendapatkan metabolit sekunder untuk keperluan obat-obatan dalam jumlah besar dan dalam waktu singkat (Faramayuda, dkk., 2016).

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).

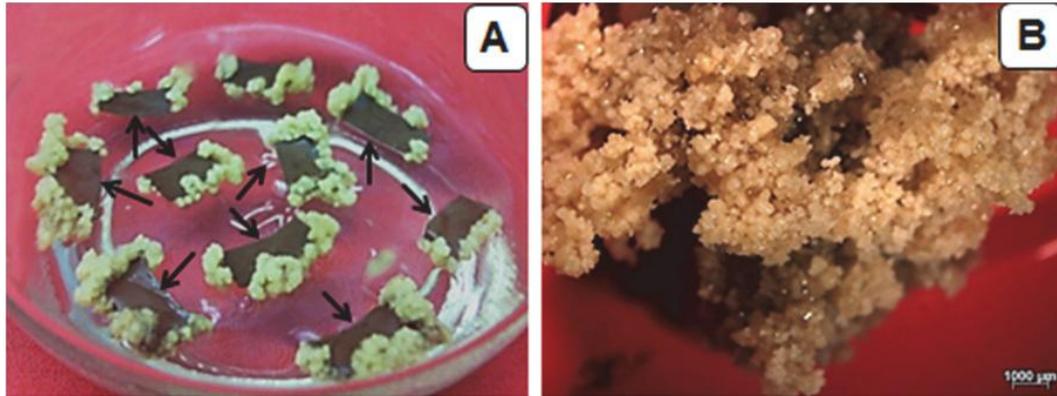
II.3.1 Kultur Jaringan Kalus

Teknik kultur *in vitro* didasarkan atas sifat totipotensi sel tumbuhan yang berarti setiap sel tumbuhan mampu menurunkan sifat dan mempunyai potensi yang sama dengan induknya untuk tumbuh dan berkembang bila diberikan lingkungan yang sesuai. Respon pertumbuhan secara umum dalam kultur *in vitro* meliputi diferensiasi langsung maupun tidak langsung yaitu melalui pembentukan

kalus. Kalus merupakan hasil antara dalam morfogenesis yang meliputi organogenesis dan embriogenesis dan akhir dari proses ini adalah terbentuknya planlet (Murni, 2010). Menurut Afnidar (2014), Kultur jaringan secara *in vitro* merupakan salah satu cara untuk produksi metabolit sekunder dengan kondisi lingkungan dapat diatur dan memungkinkan pula mengatur proses metabolismenya untuk memperoleh hasil yang sebesar-besarnya.

Beberapa keuntungan pemanfaatan teknik kultur jaringan dalam produksi senyawa metabolit sekunder dibandingkan dengan cara konvensional antara lain: (1) menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang lebih konsisten dalam waktu lebih singkat (2) faktor lingkungan dapat diatur dan dikendalikan sehingga tidak akan dipengaruhi oleh iklim, hama dan penyakit, musim dan faktor lainnya (3) mutu dari senyawa metabolit sekunder yang diproduksi lebih baik dan sistem produksi yang dapat diatur (Purnmaningsih dan Misky, 2011).

Kalus merupakan sel-sel yang muncul bergerombol pada salah satu atau seluruh irisan eksplan. Kalus yang muncul dari daerah bekas pelukaan akan berwarna putih, lama kelamaan berubah menjadi kalus yang berwarna hijau. Tahapan pembentukan kalus pada eksplan yaitu kalus yang muncul pada bekas potongan pada eksplan awalnya bersifat remah, selanjutnya ketika sel terus berproliferasi maka lama-kelamaan kalus menjadi kompak dan berwarna putih. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi (Faramayuda, dkk., 2016).



Gambar 5. Kalus kopi robusta secara makroskopis (A) dan mikroskopis (B).
Sumber: Ibrahim dan Sri, 2017

Pembentukan kalus embriogenik dalam hal ini morfogenesis eksplan pada kultur *in vitro* sangat tergantung dari rasio auksin dan sitokinin yang diberikan pada media perlakuan. Umumnya pembentukan kalus terjadi apabila konsentrasi auksin dan sitokinin diberikan dalam konsentrasi tinggi (Ibrahim dan Sri, 2017).

Pembentukan kalus sangat dipengaruhi oleh jenis eksplan dan zat pengatur tumbuh yang digunakan. Eksplan daun dengan jaringan yang meristematik akan lebih mudah membentuk kalus dibanding dengan jaringan yang sudah tua. Eksplan dari daun lebih banyak mengandung senyawa pektat dan protein (Purnmaningsih dan Misky, 2011).

Pembentukan kalus embriogenik merupakan tahapan penting yang harus diperhatikan dalam pembentukan embriogenesis somatik tidak langsung. Semakin banyak kalus embriogenik yang didapatkan maka semakin besar peluang untuk mendapatkan embrio somatik. Hal ini dikarenakan hanya kalus embriogenik yang dapat berkembang menjadi embrio somatik. (Ibrahim dan Sri, 2017).

Terdapat lima fase pertumbuhan kalus, yaitu: 1) fase lag, yaitu fase persiapan pembelahan sel, 2) fase eksponensial yaitu fase di mana laju pembelahan sel tertinggi, 3) fase linier, yaitu fase dari pembelahan sel mulai

melambat tetapi laju dari perkembangan sel meningkat, 4) fase perlambatan, di mana laju pembelahan sel dan pemanjangan sel menurun, 5) fase stasioner, di mana jumlah dan ukuran sel konstan stabil. Pada umumnya senyawa metabolit sekunder mulai terbentuk pada awal fase stasioner. Namun pada beberapa tanaman, produksi metabolit sekunder bisa juga terjadi pada fase pertengahan sampai fase akhir eksponensial (Purnmaningsih dan Misky, 2011).

II.3.2 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

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 (Lestari, 2011).

Kombinasi zat pengatur tumbuh yang tepat merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan kultur kalus. Ada tiga jenis zat pengatur tumbuh yang dibutuhkan untuk menginduksi pembelahan sel yaitu kelompok auksin yang meliputi IAA, IBA, NAA dan 2,4D; kelompok sitokinin dan adenin, meliputi BA, BAP, DMAA, Ad-SO₄ dan kinetin serta kelompok giberelin, yaitu GA₃. Pembentukan kalus dapat diinduksi dengan cara mengatur pemberian zat pengatur tumbuh dengan jenis dan konsentrasi yang tepat (Shofiyani dan Agus, 2010).

Pembentukan kalus terjadi jika perbandingan auksin dan sitokinin dalam keadaan yang seimbang. Kultur jaringan kalus berarti menginduksi dari bagian tanaman tertentu yang dirangsang secara hormonal. Kesesuaian dan ketepatan

pemilihan jenis dan perimbangan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan akan mempengaruhi keberhasilan pembentukan kalus pada eksplan yang digunakan. Ketidakmampuan eksplan membentuk kalus lebih disebabkan oleh karena kurang tepatnya menggunakan zat pengatur tumbuh yang digunakan (Shofiyani dan Agus, 2010).

Zat pengatur tumbuh telah diketahui memegang peran penting dalam menentukan arah pertumbuhan suatu kultur. Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik. Selain auksin, pemberian zat pengatur tumbuh sitokinin juga berpengaruh terhadap diferensiasi sel dalam proses embriogenesis somatik. Beberapa jenis sitokinin yang biasa dikombinasikan dengan auksin dalam menginduksi embrio somatic kopi diantaranya adalah BA, kinetin dan 2-ip (Ibrahim, dkk., 2012).

Senyawa 2,4-D merupakan auksin kuat yang sering digunakan secara tunggal untuk menginduksi terbentuknya kalus dari berbagai jaringan tanaman. Zat pengatur tumbuh ini juga efektif untuk inisiasi kalus. Penggunaan kombinasi antara auksin (2,4-D) dengan sitokinin (Benzyl Adenin ataupun kinetin) akan meningkatkan proses induksi kalus (Shofiyani dan Agus, 2010).

Selain perimbangan zat pengatur tumbuh yang digunakan untuk induksi kalus, penggunaan sumber eksplan juga berpengaruh terhadap keberhasilan induksi kalus. Penggunaan bagian tanaman yang masih muda atau meristematik akan lebih memudahkan induksi kalus dibandingkan jaringan yang sudah mengalami pendewasaan seperti organ daun. Hal ini berkaitan dengan kondisi totipotensi bahan tanam (eksplan), dimana pada umumnya sifat totipotensi lebih

banyak dimiliki oleh bagian tanaman yang masih juvenil, muda dan banyak dijumpai pada daerah daerah meristematik tanaman seperti bagian tunas aksilar (Shofiyani dan Agus, 2010).

Morfogenesis dari eksplan bergantung dari interaksi antara auksin dan sitokinin, selanjutnya dinyatakan Salisbury dan Ross (2000) bahwa kinetin adalah zat pengatur tumbuh yang sangat aktif dari kelompok sitokinin. Pengaruh sitokinin dalam kultur *in vitro* antara lain pembelahan sel, proliferasi dan morfogenesis pucuk (Murni, 2010).

Metabolit sekunder biasanya akan bereaksi dengan ZPT yang ada pada media untuk mendorong pembelahan sel yang berlebihan sehingga terbentuk kalus. Kalus yang biasanya dihasilkan melalui kultur *in vitro* tidak terbentuk karena pelukaan yang terjadi pada jaringan daun sudah tidak merespon ZPT pada media. Pembelahan sel yang mengarah pada terbentuknya kalus terjadi karena adanya respon terhadap luka dan suplai hormon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan (Ibrahim dan Sri, 2017).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

III.1.1 Alat

Alat yang digunakan adalah botol kultur, cawan petri, *handspray*, *autoklaf*, rak kultur, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, mikro pipet, pipet *bulb*, pH meter, timbangan analitik, *Laminar Air Flow* (LAF), bunsen, pinset, pisau dan *scalpel*, *beaker glass*, erlenmeyer, ATK, dan kamera, mortar, bejana, botol kecil, *rotary evaporator*, tabung reaksi, rak tabung, corong, pipet tetes, corong pisah, gelas ukur, labu ukur, gelas piala dan seperangkat spektrofotometri UV-Vis.

III.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media pertumbuhan Murashige-Skoog (MS) murni, bubuk L-Metionin, agar, eksplan tanaman kopi robusta, zat pengatur tumbuh Kinetin dan 2,4-D, sterilan klorox atau bayclin, alkohol 70%, alkohol 96%, aquades, Fungisida berbahan dasar mankozeb, Sodium hipoklorit, aluminium foil, NaOH, HCl, Vitamin C, detergen, spiritus, *tissue*, kertas label, *Plastic seal*, *Cling wrap*, plastik sampel, korek api, pelarut kloroform, CaCO₃, H₂SO₄ 30%, reagen parry, amonia encer, standar kafein.

III.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan 1 faktorial yaitu penambahan L-Metionin pada media MS + 2,0 mg/L 2,4-D + 0,5 mg/L Kinetin (MS+ZPT) terhadap eksplan daun tanaman kopi robusta *Coffea canephora* L.

Perlakuan L-metionin pada Media (MS+ZPT) dilakukan sebanyak 6 taraf 0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L dengan ulangan masing-masing sebanyak 5 kali, sehingga terdapat 30 unit. Setiap unit terdapat 5 eksplan sehingga total eksplan sebanyak 150 eksplan.

III.3 Prosedur Penelitian

III.3.1 Sterilisasi

III.3.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan harus dalam keadaan steril. Sebelum di sterilkan menggunakan *autoklaf*, alat gelas dan alat logam terlebih dahulu dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air mengalir sampai bersih, kemudian dibungkus dengan plastik. Alat-alat gelas, alat-alat logam, akuades disterilkan dengan *autoklaf* selama 60 menit dan media pertumbuhan selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Alat penanaman setelah disterilkan di *autoklaf*, alat berupa pinset, *scalpel*, dan gunting direndam dengan alkohol 96% lalu panaskan di atas nyala api bunsen dengan tujuan agar tetap steril saat penanaman berlangsung.

III.3.1.2 Sterilisasi Sampel

Sampel daun muda yang sudah membuka sempurna dipetik dan dibersihkan menggunakan air mengalir. Daun dibilas dengan deterjen secara perlahan dan dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan fungisida berbahan dasar mankozeb dengan konsentrasi 0,2% selama 15 menit. Setelah dibilas dengan air, daun dipindahkan ke dalam *laminar air flow*, kemudian disterilisasi menggunakan alkohol (70%), diikuti dengan *sodium hypochlorite* dengan konsentrasi 0,25% dan 0,35%, masing-masing selama 7 menit. Selanjutnya, daun dibilas aquades steril sebanyak 3 kali.

III.3.1.3 Sterilisasi Ruang Kerja

Laminar Air Flow (LAF) sebelum digunakan terlebih dahulu disemprotkan alkohol 70% dan dilap menggunakan *tissue*. Sinar UV dinyalakan selama 1-2 jam sebelum LAF digunakan, kemudian dimatikan. Selanjutnya, dinyalakan blower selama ± 5 menit dan setelah itu dinyalakan lampunya.

III.3.2 Pembuatan Larutan

III.3.2.1 Pembuatan Larutan Stok L-Metionin

Ditimbang bubuk L-Metionin sebanyak 0,2 gram kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* dan ditambahkan 200 ml aquades steril untuk pembuatan stok L-metionin 1000 ppm. Stok L-Metionin dihomogenkan menggunakan *hotplate* dengan *magnetic stirrer*. Setelah homogen, stok L-Metionin dituang ke dalam erlenmeyer 200 mL kemudian ditutup dengan aluminium foil dan diberi label lalu disimpan di dalam kulkas.

III.3.2.2 Pembuatan Media MS + Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Media Murashige-Skoog (MS) instan ditimbang sebanyak 4,43 gr/L, gula sebanyak 30 gr/L, dan agar sebanyak 7 gr/L masing-masing ke dalam *beaker glass*. Ditambahkan ZPT 2,4-D sebanyak 2,0 mg dan Kinetin sebanyak 0,5 mg ke dalam *beaker glass* tersebut lalu ditambahkan aquades steril hingga 1000 ml.

III.3.2.3 Pembuatan Media MS + Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) + L-Metionin

Tabel 1. Pembuatan MS + ZPT + L-Metionin

Larutan	L-metionin (L-met)					
	0 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	20 mg/L	25 mg/L
MS + ZPT	0 ppm	5 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm
	L-met	L-met	L-met	L-met	L-met	L-met
	+	+	+	+	+	+
	(MS+ZPT)	(MS+ZPT)	(MS+ZPT)	(MS+ZPT)	(MS+ZPT)	(MS+ZPT)

Untuk memudahkan pembuatan larutan MS + ZPT + L-Metionin, maka larutan L-Metionin dibagi menjadi 6 taraf konsentrasi yang berbeda (Tabel 1). Medium MS+ZPT 1.000 ml dibagi menjadi 6 bagian sehingga menjadi 160 ml. Konsentrasi L-Metionin untuk 5 ppm adalah sebanyak 0,8 ml, untuk 10 ppm sebanyak 1,6 ml, untuk 15 ppm sebanyak 2,4 ml, untuk 20 ppm sebanyak 3,2 ml, dan untuk konsentrasi 25 diambil stok L-Metionin sebanyak 4 ml. Masing-masing perlakuan tersebut untuk membuat media (MS+ZPT) 160 ml. Dihomogenkan dengan cara dimasak hingga mendidih dan diukur pH larutan media hingga 5,8.

Campuran media tersebut dituangkan ke dalam botol kultur steril dengan takaran ± 25 ml/botol untuk masing-masing perlakuan dan ulangan. Botol kultur ditutup dengan *Plastic seal* serta diberi label. Dilakukan sterilisasi medium menggunakan *autoklaf* dengan temperatur 121°C selama 15 menit. Setelah itu botol kultur disimpan di ruang kultur pada suhu 25⁰C sebelum digunakan.

III.3.3 Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) secara aseptis. Eksplan berupa daun muda yang telah disterilkan dipotong-potong dengan ukuran ± 1 cm x 1 cm dalam cawan petri. Eksplan yang telah dipotong-potong dimasukkan ke dalam setiap botol kultur yang berisi media perlakuan. Setiap botol kultur memiliki 5 potongan eksplan. Kemudian botol ditutup kembali dengan *Plastic seal* serta di *cling wrap* lalu disimpan di rak kultur.

III.3.4 Pemeliharaan Kalus

Botol kultur yang berisi eksplan diletakkan pada rak kultur, dan diinkubasi dalam ruang gelap pada temperatur $\pm 25^{\circ}\text{C}$ selama ± 2 bulan. Pemeliharaan

dilakukan pula secara aseptis dengan memisahkan botol yang telah terkontaminasi oleh mikroorganisme dari ruang inkubasi. Dilakukan penyemprotan botol-botol kultur secara berkala dengan menggunakan alkohol 70%.

III.4 Parameter Pengamatan

III.4.1 Tahap Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan 3 tahap: Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat ada atau tidaknya perkembangan dan munculnya kalus pertama kali pada eksplan, serta ada tidaknya kontaminasi pada eksplan. Pengamatan kedua yaitu pengamatan akhir tekstur dan warna kalus. Pengamatan ketiga yaitu pengamatan diakhir penelitian yang dilakukan setelah 77 hari penanaman terdiri dari pengamatan presentase eksplan membentuk kalus dan uji kadar kafein pada kalus kopi robusta *Coffea canephora* L.

III.4.2 Parameter Pengamatan Kalus

Pengamatan munculnya kalus pertama kali dinyatakan dalam HST (Hari Setelah Tanam) yang ditandai dengan pembengkakan pada eksplan. Pengamatan kontaminasi dengan mengamati secara langsung yang terjadi pada media dan eksplan yang dapat diakibatkan oleh mikroorganisme. Tekstur dan warna kalus diamati secara visual pada penampakan kalus yaitu kalus remah, kalus kompak, dan kalus intermediet.

Pengamatan presentase kalus yang dilakukan dengan menghitung banyaknya eksplan yang membentuk kalus dibandingkan dengan total eksplan yang ditanam dilakukan di akhir pengamatan, dengan rumus:

- Presentasi eksplan berkalus = $\frac{\text{eksplan berkalus tiap perlakuan}}{\text{total eksplan tiap perlakuan}} 100\%$

III.4.3 Pengamatan Kandungan Metabolit Sekunder Kafein

III.4.3.1 Pembuatan Ekstrak Kafein Kalus

Kalus pada perlakuan (Tabel 1) ditempatkan pada mortar hingga halus, kemudian diukur beratnya menggunakan timbangan analitik. Masing-masing perlakuan ditambahkan 50 ml air panas dan ditambahkan CaCO_3 setengah dari berat hasil timbangan kalus kedalam Erlenmeyer lalu disaring. Ampas dibilas dengan 50 ml air panas sebanyak 2 kali dan disaring sampai volume filtrat mencapai 150 ml. setelah ditambah 5 ml H_2SO_4 30% selanjutnya volume filtrat direduksi dengan pemanas sampai 50 ml. Filtrat kemudian ditambah 2 ml NaOH 10% serta kloroform sebanyak 75 ml pada corong pemisah, diulangi sebanyak 2 kali. Fraksi kloroform diuapkan pada suhu 70-80°C, kemudian hasilnya ditambah 50 ml aquades dan dihomogenkan.

III.4.3.2 Uji Kualitatif dengan Metode Parry

Dipipet 1 ml masing-masing filtrat sampel ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan reagen parry sebanyak 3 tetes dan dihomogenkan. Kemudian ditambahkan ammonia encer sebanyak 3 tetes dan dihomogenkan. Diamati perubahan warna yang terjadi, apabila larutan berwarna biru tua kehijauan menandakan larutan positif kafein.

III.4.3.3 Metode Spektrofotometri UV-Vis

Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan mendeteksi absorbansi larutan standar pada rentang panjang gelombang 200-700 nm dengan menggunakan instrument spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan berdasarkan penentuan panjang gelombang adalah

272 nm. Kadar kafein pada tiap-tiap sampel diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 272 nm.

III.4.3.3.1 Pembuatan Larutan Baku Kafein

Dibuat larutan baku kafein 1000 ppm. Ditimbang sebanyak 250 mg kafein, dimasukkan ke dalam gelas piala, dilarutkan dengan akuades secukupnya, dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL kemudian diencerkan dengan akuades hingga garis tanda dan dihomogenkan. Dipipet larutan standar kafein tadi sebanyak 2,5 mL, dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL kemudian diencerkan dengan akuades hingga garis tanda dan dihomogenkan.

III.4.3.3.2 Pembuatan Kurva Standar

Pengukuran sampel didahului dengan pengukuran larutan baku kafein untuk mengetahui panjang gelombang maksimum. Pembuatan larutan standar didahului dengan mengambil: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 mL dari larutan standar kafein 100 ppm dan diencerkan menjadi 5 mL sehingga konsentrasi larutan standar yang diperoleh berturut-turut adalah : 1; 2; 4; 8; 16 mg/L.

III.4.3.3.3 Uji Kandungan Kafein Kalus

Hasil Ekstrak kafein dari masing-masing sampel (Tabel 1) dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, kemudian ditentukan kadarnya dengan alat spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 272 nm.

III.5 Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) kemudian jika memberikan pengaruh nyata dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.