

**PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK TOMAT *Lycopersicum
esculentum* var. intan DAN 2,4 DICHLOROPHENOXYACETIC ACID
TERHADAP INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ARABIKA
Coffea arabica L. SECARA IN VITRO**

HASMAWATI

H411 16 521



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

**PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK TOMAT *Lycopersicum
esculentum* var. intan DAN 2,4 DICHLOROPHENOXYACETIC ACID
TERHADAP INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ARABIKA
Coffea arabica L. 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

HASMAWATI

H411 16 521

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

HALAMAN PENGESAHAN

PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK TOMAT *Lycopersicum esculentum* var. intan DAN 2,4 DICHLOROPHENOXYACETIC ACID TERHADAP INDUKSI KALUS TANAMAN KOPI ARABIKA *Coffea arabica* L. SECARA IN VITRO

Disusun dan diajukan oleh:

**HASMAWATI
H411 16 521**

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 melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada Rasulullah SAW yang mengantarkan manusia dari zaman kegelapan ke zaman yang terang benderang ini.

Skripsi dengan judul **“Pengaruh Penambahan Ekstrak Tomat *Lycopersicum esculentum* var. intan Dan 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid Terhadap Induksi Kalus Tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L. Secara In Vitro”** 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 terkasih. Pada kesempatan ini, penulis memberikan penghargaan yang setinggi-tingginya dan ribuan ucapan terima kasih kepada keluarga saya terkhusus kepada kedua orang tua saya, Ibunda tercinta Hj. Haya dan Ayahanda tercinta Marsuki yang senantiasa setulus hati memberikan doa, kasih sayang, semangat dan dukungan yang besar kepada penulis dalam menyelesaikan studi ini. Kemudian Kakak laki-laki Hasnawir,

Muhammad Ali, Muhammad Syukur, dan Kakak perempuan Hasniar yang turut mendukung penulis untuk menyelesaikan skripsi.

Terima kasih penulis ucapkan kepada bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si selaku pembimbing utama yang telah saya anggap seperti orang tua kedua di kampus, yang telah banyak meluangkan waktu kepada penulis dalam memberikan bimbingan, motivasi dan pengetahuan yang berharga dalam penyusunan skripsi ini. Dalam proses penelitian skripsi penulis banyak mendapatkan halangan dan hambatan, terima kasih karena Pak Andi selalu memberikan kami saran berupa solusi agar skripsi ini dapat selesai dengan baik. Terima Kasih juga saya ucapkan kepada ibu Dr. Eva Johannes, M.Si selaku pembimbing pertama yang tak jemu membimbing dan memberikan masukan yang membangun selama tahap penelitian penyusunan skripsi.

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 dan selaku penguji sidang sarjana, terima kasih atas segala kritik dan saran yang membangun.
4. Bapak Dody Priosambodo, S.Si., M.Si. selaku penasehat akademik sekaligus penguji sidang sarjana. Terima kasih atas saran dan bimbingan, dan segala perhatian dalam perkembangan akademik penulis.

5. 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.
6. 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.
7. Kepada Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin, terkhusus kepada teman-teman asisten Laboratorium sekaligus teman seperjuangan kultur jaringan. Ada Fatimah, Deka, Fahrani, dan juga ada Aulia dan Wiwik teman sekamar di tempat Magang. Terima Kasih banyak atas dukungan dan kekompakannya.
8. Kepada Syianto Tri Putra Alam Mulyoto, terima kasih atas dukungan dan perhatiannya dari mahasiswa baru sampai mahasiswa tua dan semoga seterusnya.
9. Kepada Sahabat Geng Incess terkasih, Juli Model, Eka jupe, Mala Tiktok. Terima Kasih kalian selalu ada untuk kembalikan tawa penulis.
10. Kepada Teman-teman terbaik, Vina Nabila, Nuzul, Pramegita, Utaripang, Kak Dita, Muh. Filayati, Elma, Tia, Alda, Intan, Dhestar.
11. Kepada Keponakan saya yang selalu memberi saya dukungan dan tawa, Putra, Aulia, Feri, Arya, Sila, Rara, Rafa.

12. Kepada teman-teman posko KKN Gel. 102, KKN SDA Kabupaten Maros, Kecamatan Tompobulu. Aimi, Ardi, Pai, Kak Ira, Kak Desi, Kak Luigi, yang selalu memberi semangat dan doa.
13. Kepada Angkatan Biologi 2016 (Biodiversity), Terima kasih atas kenangan yang terukir selama kurang dari 4 tahun, dan saling membantu dalam suka dan duka.
14. 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, Juli 2020

Penulis

ABSTRAK

Penelitian tentang pengaruh penambahan ekstrak tomat *Lycopersicum esculentum* var. intan dan 2,4 dichlorophenoxyacetic acid terhadap induksi kalus tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L. secara in vitro telah dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Gowa dan Laboratorium Kultur Jaringan Biologi FMIPA Unhas. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak tomat dan 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L. menggunakan teknik kultur jaringan tanaman. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua faktorial yaitu ekstrak tomat dengan empat taraf konsentrasi yaitu 0; 10%; 15%; 20% dan 2,4-D dengan empat taraf konsentrasi yaitu 0; 1 ppm; 2 ppm; 3 ppm. Tiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Hasil yang signifikan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ekstrak tomat 10% dan 2,4-D 2 ppm ($A_{10}D_2$) memberikan hasil yang signifikan terhadap presentase eksplan yang membentuk kalus, waktu tumbuh kalus, dan berat basah kalus. Kombinasi ekstrak tomat 10% dan 2,4-D 1 ppm ($A_{10}D_1$); 2 ppm ($A_{10}D_2$); dan 3 ppm ($A_{10}D_3$) menghasilkan warna kalus putih, 3 perlakuan tanpa penambahan ekstrak tomat yaitu A_0D_1 ; A_0D_2 ; dan A_0D_3 menghasilkan warna kalus putih kecoklatan, sedangkan tekstur kalus remah dihasilkan oleh seluruh perlakuan yang berkalus.

Kata Kunci: Kopi Arabika *Coffea arabica* L., Kalus, Ekstrak Tomat, 2,4-D, Penambahan Bahan Organik, In Vitro

ABSTRACT

Research about the effect of tomato extract *Lycopersicum esculentum* var. intan and 2,4 dichlorophenoxyacetic acid addition on callus induction of Arabica Coffee plant *Coffea arabica* L. in vitro has been done at Plant Tissue Culture Laboratory the UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Gowa and Biology Tissue Culture Laboratory of FMIPA Unhas. The research aims to determine the effect concentrations of tomato extract and 2,4-D on callus induction of Arabica Coffee *Coffea arabica* L. using plant tissue culture techniques. The experiment was carried out using a completely randomized design with two factorial that is tomato extract with four levels concentrations 0; 10%; 15%; 20% and 2,4-D with four levels concentrations 0; 1 ppm; 2 ppm; 3 ppm. Each treatment was repeated 3 times. The data then analyzed with *Kruskall-Wallis* Test. The significant result continued with *Mann-Whitney U* Test. The results point the addition of tomato extract 10% and 2,4-D 2 ppm (A₁₀D₂) provided significant result to the percentage of explants that formed callus, callus growing time, and callus fresh weight. Combination of 10% tomato extract and 2,4-D 1 ppm (A₁₀D₁); 2 ppm (A₁₀D₂); and 3 ppm (A₁₀D₃) produced a white colored callus, the three other treatments without the addition of tomato extract A₀D₁; A₀D₂; and A₀D₃ produces a brownish white callus, while the friable callus is produced by all explants that formed callus.

Key Words: Arabica Coffee *Coffea arabica* L., Callus, Tomato Extract, Organic Additive, In Vitro

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 Sejarah Kopi di Indonesia.....	6
II.2 Tanaman Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	7
II.2.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	7
II.2.2 Morfologi Tanaman Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	7
II.2.2 Peranan Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L. di Indonesia	9
II.3 Teknik Kultur Jaringan Tanaman Kopi.....	11
II.4 Zat Pengatur Tumbuh Kultur Jaringan.....	14
II.5 Ekstrak Tomat sebagai Zat Pengatur Tumbuh Alami.....	17

II.6 Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.....	19
BAB III METODE 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	25
III.3.1 Pengambilan Sampel	25
III.3.2 Sterilisasi.....	25
III.3.2.1 Sterilisasi Alat	25
III.3.2.2 Sterilisasi Eksplan.....	26
III.3.2.3 Sterilisasi Ruang Kerja.....	26
III.3.3 Pembuatan Larutan Stok.....	26
III.3.3.1 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Tomat.....	26
III.3.3.2 Pembuatan Larutan Stok Hormon 2,4-D.....	27
III.3.4 Pembuatan Medium.....	27
III.3.4.1 Pembuatan Medium MS.....	27
III.3.4.2 Pembuatan Medium MS + Ekstrak Tomat.....	27
III.3.4.3 Pembuatan Medium MS + 2,4-D.....	28
III.3.4.4 Pembuatan MS + Ekstrak Tomat + 2,4-D.....	29
III.3.5 Inisiasi Eksplan.....	29
III.3.6 Pemeliharaan Eksplan.....	30
III.3.7 Parameter Pengamatan.....	30
III.3.8 Analisis Data.....	31

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
IV.1 Presentase Eksplan yang Membentuk Kalus.....	33
IV.2 Waktu Tumbuh Kalus.....	37
IV.3 Berat Basah Kalus.....	41
IV.4 Warna Kalus.....	45
IV.5 Tekstur Kalus.....	47
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	50
V.1 Kesimpulan.....	50
V.2 Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA.....	51
LAMPIRAN.....	56

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Komposisi kimia buah tomat <i>Lycopersicum esculentum</i> var. intan per 100	18
Tabel 2. Pembuatan Medium MS + Ekstrak Tomat + 2,4-D.....	29
Tabel 3. Hasil Uji Lanjut <i>Mann-Whitney</i> pada Persentase Kultur yang Membentuk Kalus pada 60 HST.....	35
Tabel 4. Hasil uji lanjut <i>Mann-Whitney</i> pada waktu tumbuh kalus 60 HST	39
Tabel 5. Hasil Uji Lanjut <i>Mann-Whitney</i> pada Berat Basah Kalus 60 HST	42
Tabel 6. Data Warna Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L. 60 HST.....	45
Tabel 7. Data Tekstur Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L. 60 HST.....	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tanaman Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	8
Gambar 2. Daun dan Biji Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	9
Gambar 3. Kalus Daun Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	22
Gambar 4. Grafik Rata-rata Persentase Kultur yang Membentuk Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L. pada 60 HST.....	33
Gambar 5. Grafik rata-rata waktu tumbuh kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L. pada 60 HST.....	37
Gambar 6. Grafik rata-rata berat basah kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L. pada 60 HST.....	41
Gambar 7. Warna Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.....	46
Gambar 8 . Tekstur Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Komposisi Media Murashige and Skoog (MS)	57
Lampiran 2.	Skema Kerja	58
Lampiran 3.	Pengambilan Sampel Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	59
Lampiran 4.	Sterilisasi Alat dan Ruang Kerja	60
Lampiran 5.	Prosedur Pembuatan Larutan Stok	61
Lampiran 6.	Prosedur Pembuatan Medium	63
Lampiran 7.	Inisiasi Eksplan Daun Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	71
Lampiran 8.	Pemeliharaan Eksplan Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	74
Lampiran 9.	Pengamatan Eksplan Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	75
Lampiran 10.	Hasil Pengamatan Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L. pada 60 HST	77
Lampiran 11.	Data Hasil Pengamatan Presentase Eksplan yang Membentuk Kalus.....	79
Lampiran 12.	Tabel Uji <i>Kruskal-Wallis</i> dan Uji Lanjut <i>Mann Whitney U</i> Presentase Eksplan yang Membentuk Kalus	80
Lampiran 13.	Tabel Uji <i>Kruskal-Wallis</i> dan Uji Lanjut <i>Mann Whitney U</i> Waktu Tumbuh Kalus	82
Lampiran 14.	Tabel Uji <i>Kruskal-Wallis</i> dan Uji Lanjut <i>Mann Whitney U</i> Berat Basah Kalus	84

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kopi adalah tanaman tropis yang tumbuh pada ketinggian 10-2000 m di atas permukaan laut (Wongsa *et al.*, 2019). Kopi bukanlah tanaman asli Indonesia. Tetapi di beberapa daerah, kopi menyebar ke hampir seluruh pelosok pulau Indonesia, yang dahulu kala disebut sebagai “Nusantara” (Wahyudi dan Misnawi, 2012). Kopi arabika *Coffea arabica* berasal dari Afrika, yaitu dari daerah pegunungan di Etiopia. Namun demikian, kopi arabika baru dikenal oleh masyarakat dunia setelah tanaman tersebut dikembangkan di luar daerah asalnya, termasuk di Indonesia (Rahardjo, 2017).

Indonesia adalah negara yang sangat besar, terdiri dari ribuan pulau, dan secara geografis, sosial dan kondisi tradisional sangat bervariasi. Akibatnya, negara memproduksi banyak produk dengan spesifik karakteristik lokal dan reputasi pasar, seperti kopi Toraja dari Sulawesi Selatan (Mawardi, 2009). Babova *et al.* (2016) menyatakan bahwa produksi kopi didasarkan pada tiga kopi utama (Rubiaceae), yaitu *Coffea arabica* L. (dikenal sebagai kopi arabika), *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner (dikenal sebagai kopi robusta), dan *Coffea liberica* Bull. Ex Hiern (dikenal sebagai kopi Liberia/liberika). Komersial paling penting adalah spesies Kopi arabika *Coffea arabica*, yang menyediakan lebih dari 95% populasi kopi dunia.

Indonesia adalah produsen kopi terbesar ketiga di dunia setelah Brazil dan Vietnam dengan menyumbang sekitar 6% dari produksi total kopi dunia, dan Indonesia merupakan pengekspor kopi terbesar keempat dunia dengan pangsa pasar sekitar 11% di dunia (Nugrawati dan Mumammad, 2018). Selama ini Indonesia dikenal sebagai penghasil kopi robusta terbesar di dunia ($\pm 23,6\%$). Di sisi lain, meskipun kontribusi kopi arabika Indonesia dalam perdagangan kopi

dunia secara kuantitatif masih sangat kecil, namun secara kualitatif sangat disukai konsumen dengan keanekaragaman jenis serta cita rasanya yang spesifik.

Kopi arabika *Coffea arabica* L. memiliki kualitas dan cita rasa yang lebih khas, sehingga memiliki harga lebih tinggi di pasaran internasional (Ibrahim *et al.*, 2012). Kopi ini ditanam pada dataran yang memiliki iklim kering sekitar 1350-1850 m dari permukaan laut. Sedangkan di Indonesia kopi arabika *Coffea arabica* L. dapat tumbuh dan berproduksi pada ketinggian 1000-1750 m dari permukaan laut (Yusdiali, 2013).

Karena kopi arabika *Coffea arabica* L. banyak digemari oleh konsumen dalam terutama luar negeri, maka para petani kopi banyak yang beralih untuk menanam kopi arabika dibandingkan jenis kopi lain. Namun akibat iklim di Indonesia khususnya di Sulawesi Selatan, maka sulit untuk mendapatkan bibit kopi arabika berkualitas. Salah satu metode yang dapat dilakukan dalam penyediaan bibit unggul tanaman kopi dalam jumlah yang banyak dalam waktu relatif singkat adalah perbanyakan secara vegetatif melalui teknik kultur jaringan (Hendaryono dan Ari, 1994).

Bioteknologi tanaman saat ini telah berkembang sebagai era baru ilmu pengetahuan dan teknologi dimana diantaranya yaitu ilmu kultur jaringan tanaman (Bhatia dan kiran, 2015). Lee *et al.* (2019), menambahkan bahwa manfaat kultur jaringan tanaman sangat luas di dunia pertanian dalam banyak hal, yang pertama adalah itu memungkinkan untuk produksi sejumlah besar tanaman di waktu yang sangat singkat. Kultur jaringan tanaman juga menguntungkan petani karena banyaknya jumlah bebas penyakit tanaman dapat diproduksi menggunakan jaringan yang dikumpulkan dari satu induk tanama. Perbanyakan

melalui kultur jaringan juga menghilangkan kemungkinan gangguan dalam musim tanam karena dapat dilakukan secara *in vitro*, dengan lingkungan terkontrol.

Dalam keberhasilan kultur jaringan yang perlu diperhatikan diantaranya yaitu medium kultur. Medium kultur sangat besar pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan serta bibit yang dihasilkan. Penambahan kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) seperti auksin dan sitokinin sangat dapat menjadi faktor penentu keberhasilan kultur jaringan. Dari banyak penelitian yang ada, masih banyak mengandalkan zat pengatur tumbuh kimiawi yang membutuhkan biaya yang cukup tinggi. Seperti penelitian yang dilakukan Priyono tahun 1993 menggunakan IAA, BAP dan Adenine sulfat. Giridhar tahun 2004 menggunakan Thidiazuron, sementara Oktavia tahun 2003, Samson tahun 2006, dan Arimarsetiowati tahun 2011 menggunakan 2,4-D dan 2-iP (Ibrahim *et al.*, 2013). Sementara penelitian terbaru oleh Nurwahyuni (2015) menggunakan zat pengatur tumbuh BAP, 2,4-D, NAA, IBA, dan Kinetin. Oleh karena itu dibutuhkan penelitian yang mampu memanfaatkan bahan alami yang tersedia sebagai zat pengatur tumbuh, agar dapat mengurangi segala dampak buruk zat pengatur tumbuh kimiawi seperti mengurangi biaya penelitian dan mempergunakan bahan alam yang tersedia.

Zat pengatur tumbuh golongan sitokinin dapat diperoleh secara alami dari ekstrak tomat *Solanum lycopersicum* L. Buah tomat yang matang mengandung hormon sitokinin yang aktif (Sari *et al.*, 2019). Kandungan sitokinin berperan dalam pembelahan sel dan pembentukan tunas. Kadar sitokinin eksogen yang berasal dari kombinasi tersebut menyebabkan pembelahan sel pada jaringan meristem dapat terus ditingkatkan aktifitasnya. Selain itu menurut Dwiyani *et al.*

(2009), ekstrak tomat mengandung fosfor, kalsium, besi, kalsium, vitamin C, tiamin, protein 1 gram, vitamin A, dan vitamin K.

Dalam penelitian Dwiyani *et al.* (2009), membuktikan bahwa buah tomat yang masak mengandung sitokinin dengan konsentrasi yang rendah, sitokinin dalam buah tomat berkurang seiring masakannya buah tomat. Pemanfaatan ekstrak tomat sebagai ZPT alami juga pernah dilakukan dalam penelitian sebelumnya, menurut Sari *et al.* (2019) bahwa jumlah kalus diperoleh dari perlakuan ekstrak tomat konsentrasi 10% yaitu dengan rata-rata 2 HST menunjukkan respon positif eksplan kentang *Solanum tuberosum* L. terhadap pemberian ZPT dalam konsentrasi yang efektif.

Berdasarkan hal tersebut maka ekstrak tomat mampu menggantikan peran ZPT sintetik yang berpengaruh pada pertumbuhan tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L.. Oleh karena itu, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak tomat dan 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L. secara *in vitro*.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak tomat dan 2,4-D terhadap induksi kalus tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L. secara *in vitro*.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai konsentrasi ekstrak tomat dan 2,4-D yang mampu merangsang induksi kalus kopi

arabika *Coffea arabica* L., sehingga dapat dijadikan sumber acuan dalam usaha perbanyak bibit tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L. secara in vitro.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – Mei 2020. Penelitian kultur jaringan dilakukan Di Laboratorium Kultur Jaringan UPT Balai Benih Tanaman Hortikultura Gowa, dan Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Sejarah Kopi di Indonesia

Tanaman kopi bukan tanaman asli Indonesia (Wongsa *et al.*, 2019). Tanaman kopi dimasuk ke Indonesia pertama kali tahun 1696, bersamaan waktunya dengan digemarinya minuman kopi di kawasan Eropa. Tanaman kopi tersebut adalah jenis kopi arabika yang berasal dari Malabar-India. Sejarah mencatat bahwa untuk pertama kalinya pelelangan kopi asal Jawa di Amsterdam dilakukan tahun 1712 dan sejak itu pasaran kopi Eropa mengenal baik “Java coffee” (Herman, 2010).

Pada tahun 1878 timbul serangan penyakit karat daun yang diperkirakan berasal dari Sri Lanka dan menyebar cepat keseluruh perkebunan kopi di Jawa. Karena sulit diberantas, maka sejak tahun 1900 dikembangkan kopi jenis robusta yang relatif tahan penyakit. Jenis kopi robusta ini kemudian berkembang pesat hampir ke seluruh pelosok Nusantara dan pada saat pecah perang dunia ke-II, Hindia Belanda (Indonesia) dikenal sebagai penghasil kopi terbesar ketiga dunia setelah Brazil dan Kolumbia (Herman, 2010).

Perang dunia ke-II dan perjuangan kemerdekaan memiliki andil yang cukup besar dalam perubahan pasar kopi Indonesia. Perkebunan kopi yang ada diambil alih oleh penjajah Jepang. Setelah kemerdekaan, perkebunan di seluruh Indonesia bila tidak dibawah pengawasan pemerintah ditinggalkan begitu saja. Banyak pemilik perkebunan masa kolonial meninggalkan Indonesia untuk menghindari penangkapan. Hingga saat ini, hampir 92% produksi kopi berada di tangan petani kecil maupun koperasi. Fenomena yang sampai saat ini masih

terjadi di masyarakat Indonesia adalah kopi arabika *Coffea arabica* L. dan kopi robusta *Coffea canephora* L. terbaiknya hampir semuanya diekspor. Rakyat kebanyakan mengkonsumsi kopi kelas dua. Ironisnya biji-biji kopi terbaik ini diolah dan kembali masuk ke dalam Indonesia di bawah naungan *brand* besar seperti *Starbucks Coffee* dan *Coffee Bean* (Gumulya dan Ivana, 2017).

II.2 Tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L.

II.2.1 Klasifikasi Tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L.

Klasifikasi tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L. menurut *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) (2019), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivision	: Embryophyta
Division	: Tracheophyta
Subdivision	: Spermatophytina
Class	: Magnoliopsida
Superorder	: Asteranae
Order	: Gentianales
Family	: Rubiaceae
Genus	: <i>Coffea</i>
Species	: <i>Coffea arabica</i> L.

II.2.2 Morfologi Tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L.

Tanaman kopi merupakan tanaman semak belukar yang berkeping dua (dikotil), sehingga memiliki perakaran tunggang. Buah kopi mentah berwarna

hijau dan ketika matang akan berubah menjadi warna merah. Tanaman kopi mulai berbunga setelah berumur sekitar dua tahun. Bunga tanaman ini tersusun dalam kelompok yang tumbuh pada buku-buku cabang tanaman dan memiliki mahkota yang berwarna putih serta kelopak yang berwarna hijau. Buah kopi terdiri atas daging buah dan biji. Daging buah terdiri atas tiga bagian yaitu lapisan kulit luar (*eksokarp*), lapisan daging buah (*mesokarp*), dan lapisan kulit tanduk (*endocarp*) (Anshori, 2014). Daun tanaman kopi hampir memiliki perwatakan yang sama dengan tanaman kakao yang lebar dan tipis, sehingga dalam budidayanya memerlukan tanaman naungan (Panggabean, 2011).



Gambar 1. Tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L.
Sumber: Majalah otten coffee (2017).

Kopi Arabika *Coffea arabica* L. dikembangkan di lebih dari 60 negara beriklim tropis maupun subtropis. Kopi ini salah satu spesies dari genus *Coffea* yang bersifat menyerbuk sendiri. Kopi Arabika pada umumnya dikembangkan di daerah-daerah dengan ketinggian lebih dari 1000 m dpl (Izzah *et al.*, 2015). Mayoritas varietas kopi arabika memiliki bunga yang sangat aromatik yang

menghasilkan nektar dan serbuk sari yang berlimpah untuk menarik serangga (Kadri *et al.*, 2016).

Semakin tinggi lokasi penanaman kopi arabika *Coffea arabica* L., citarasa yang dihasilkan oleh bijinya semakin baik. Selain itu, kopi jenis ini sangat rentan pada penyakit karat daun yang disebabkan oleh cendawan *Hemileia vastatrix*, terutama pada ketinggian kurang dari 600 sampai 700 m dpl. Karat daun ini dapat menyebabkan produksi dan kualitas biji kopi menjadi turun (Indrawanto *et al.*, 2010). Oleh sebab itu, perkebunan kopi arabika hanya terdapat pada beberapa daerah tertentu.



Gambar 2. Daun dan biji kopi arabika *Coffea arabica* L.
Sumber: Pak Tani Digital, Media Online dan Pasar Online
Pertanian Indonesia (2019)

Karakter morfologi yang khas pada kopi arabika adalah tajuk yang kecil, ramping, ada yang bersifat ketai dan ukuran daun yang kecil. Biji kopi arabika memiliki beberapa karakteristik yang khas dibandingkan biji jenis kopi lainnya, seperti bentuknya yang agak memanjang, bidang cembungunya tidak terlalu tinggi, lebih bercahaya dibandingkan dengan jenis lainnya, ujung biji mengkilap, dan celah tengah dibagian datarnya berlekuk (Panggabean, 2011).

II.2.3 Peranan Tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L. di Indonesia

Kopi merupakan salah satu komoditas di dunia yang dibudidayakan di berbagai negara, termasuk Indonesia (Sebatubun dan Muhammad, 2017). Selain

itu, kopi juga mempunyai pengaruh ganda dalam perekonomian karena penanaman kopi mendorong kegiatan perekonomian lain seperti sarana produksi, pengolahan pasca panen, perdagangan biji kopi, warung-warung kopi, dan tumbuhnya industri hilir produk berbahan baku kopi (Ibrahim *et al.*, 2012). Peranan kopi yang sangat penting ini mengakibatkan tanaman kopi merupakan salah satu tanaman yang mendapat perhatian besar dari pemerintah.

Indonesia adalah produsen kopi terbesar ketiga di dunia setelah Brazil dan Vietnam dengan menyumbang sekitar 6% dari produksi total kopi dunia, dan Indonesia merupakan pengeksport kopi terbesar keempat dunia dengan pangsa pasar sekitar 11% di dunia (Nugrawati dan Muhammad, 2018). Indonesia sendiri ada tiga jenis tanaman kopi yang dikenal yaitu kopi arabika (*Coffea arabica*), kopi robusta (*Coffea canephora*), dan kopi liberika (*Coffea liberica*).

Jenis kopi yang paling populer adalah kopi arabika *Coffea arabica* L. dan kopi robusta *Coffea canephora* L.. Kopi arabika tergolong salah satu komoditas unggulan didalam subsektor perkebunan di Indonesia karena memiliki peluang pasar yang baik di dalam negeri maupun luar negeri (Bode, 2017). Dengan memiliki kualitas dan cita rasa yang lebih baik, maka harga kopi arabika *Coffea arabica* L. di pasaran internasional lebih tinggi dibandingkan kopi jenis lainnya. Menurut Randriani *et al.* (2014), bagi konsumen kualitas kopi tidak dapat dilepaskan dari citarasanya yang baik.

Selama ini Indonesia dikenal sebagai penghasil kopi robusta terbesar di dunia ($\pm 23,6\%$). Di sisi lain, meskipun kontribusi kopi Arabika Indonesia dalam perdagangan kopi dunia secara kuantitatif masih sangat kecil, namun secara kualitatif sangat disukai konsumen dengan keanekaragaman jenis serta cita

rasanya yang spesifik. Keseluruhan dari jenis kopi tersebut merupakan kopi Arabika spesialti. Kopi spesialti adalah istilah yang diberikan oleh *International Coffee Organization* (ICO) yang merujuk kepada beberapa populasi kopi arabika yang ditanam pada daerah tertentu dan menghasilkan kopi dengan rasa dan aroma istimewa. Kopi spesialti asal Indonesia makin populer mulai akhir tahun 1980-an terutama di kalangan masyarakat Amerika Serikat dan Eropa Barat.

Thamrin (2014), menjelaskan bahwa Sulawesi Selatan merupakan salah satu provinsi di Kawasan Timur Indonesia yang memiliki potensi pengembangan kopi arabika *Coffea arabica* L.. Hal ini ditunjukkan dengan areal penanaman yang cukup luas serta keadaan agroklimatologi yang sangat mendukung di daerah kabupaten Enrekang Toraja. Berdasarkan data Dinas Perkebunan Sulawesi Selatan (2005), volume ekspor kopi arabika *Coffea arabica* L. Sulawesi Selatan periode 2009 tercatat 4,11 juta ton dengan nilai ekspor sebanyak 14,45 juta dolar AS.

II.3 Teknik Kultur Jaringan Tanaman Kopi

Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi khususnya bioteknologi, pada tahun 1980-an dikenal teknik kultur jaringan tanaman kopi sebagai salah satu cara untuk menghasilkan bibit tanaman kopi yang berasal dari potongan daun berdasarkan perlakuan-perlakuan khusus (Arimarsetiowati, 2012). Manfaat kultur jaringan tanaman sangat luas di dunia pertanian dalam banyak hal, yang utama adalah memungkinkan untuk produksi sejumlah besar tanaman di waktu yang sangat singkat (Lee *et al.*, 2019).

Perbanyakan kopi arabika *Coffea arabica* L. dapat dilakukan secara generatif menggunakan biji atau secara vegetatif menggunakan setek, okulasi, dan

sambung pucuk. Perbanyak dengan kedua cara tersebut masih terdapat beberapa kelemahan. Salah satu kendalanya adalah rendahnya produksi tunas air sebagai sumber bahan tanaman yang akan diperbanyak sehingga ketersediaan bibit yang dihasilkan rendah. Penggunaan teknik kultur jaringan diharapkan dapat mengatasi masalah tersebut sehingga bahan tanam klonal berjumlah besar dapat disediakan dalam waktu yang relatif singkat. Selain itu, ketersediaan teknik perbanyakan embriogenesis somatik tanaman kopi arabika juga sangat diperlukan dalam program pemuliaan untuk mendapatkan bibit unggul dengan sifat-sifat tertentu yang diinginkan, seperti produksi tinggi sekaligus tahan hama atau penyakit (Ibrahim *et al.*, 2018).

Kemampuan eksplan membentuk embriogenesis somatik pada kopi sangat tergantung pada spesies dan genotipe/varietas. Perbedaan yang nyata dalam pembentukan embrio somatik di antara spesies dan varietas yang digunakan. Perbedaan respon ini memberikan peluang sekaligus tantangan dalam penelitian embriogenesis kopi, terutama kopi arabika yang menurut beberapa referensi lebih sulit dibandingkan dengan kopi robusta. Selain genotipe/varietas, jaringan sumber eksplan mempunyai respon yang berbeda dalam penyerapan zat pengatur tumbuh (Ibrahim *et al.*, 2012).

Kultur jaringan tanaman juga menguntungkan petani karena banyaknya jumlah bebas penyakit tanaman dapat diproduksi menggunakan jaringan yang dikumpulkan dari satu induk tanaman, baik berupa sel, jaringan atau organ tanaman. Perbanyakan melalui kultur jaringan juga menghilangkan kemungkinan gangguan dalam musim tanam karena dapat dilakukan secara *in vitro*, dengan lingkungan terkontrol (Lee *et al.*, 2019). Teknik kultur jaringan dicirikan dengan

kondisi kultur yang aseptik, penggunaan media kultur buatan dengan nutrisi lengkap dan ZPT (Zat Pengatur Tumbuh), serta kondisi ruang kultur yang suhu dan pencahayaannya terkontrol.

Menurut Hendaryono dan Ari (1994), teknik kultur jaringan sebenarnya sangat sederhana, yaitu suatu sel atau irisan jaringan tanaman yang disebut eksplan secara aseptik diletakkan dan dipelihara dalam medium padat atau cair yang cocok dan dalam keadaan steril. Dengan cara demikian sebagian sel pada permukaan irisan tersebut akan mengalami proliferasi dan membentuk kalus. Apabila kalus yang terbentuk dipindahkan ke dalam medium diferensiasi yang cocok, maka akan terbentuk tanaman kecil yang lengkap dan disebut *planlet*. Dengan teknik kultur jaringan ini hanya dari satu irisan kecil suatu jaringan tanaman dapat dihasilkan kalus yang dapat menjadi *planlet* dalam jumlah yang besar.

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 pertumbuhan merupakan campuran berbagai garam mineral, air, asam amino, vitamin, gula, zat pengatur tumbuh, dan pematat. Media pertumbuhan Murashige Skoog (MS) merupakan salah satu media yang penggunaannya lebih luas dalam kultur in vitro terutama untuk tumbuhan berkayu seperti tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L. (Murni, 2010).

Menurut Yustisia *et al.* (2018) dalam penelitiannya, membuktikan bahwa media Murashige dan Skoog (MS) cukup memenuhi unsur makro, mikro dan vitamin untuk pertumbuhan tanaman. Kebutuhan nutrisi mineral untuk tanaman

yang di kultur pada dasarnya sama dengan kebutuhan hara tanaman yang di tumbuhkan di tanah. Unsur unsur hara yang di butuhkan tanaman di lapangan merupakan kebutuhan pokok yang harus tersedia dalam media kultur jaringan. Antara lain unsur hara makro dan unsur hara. Selain itu, penggunaan media MS dapat memacu pertumbuhan organ vegetatif, daun merupakan komponen utama suatu tumbuhan untuk melaksanakan proses fotosintesis.

II.4 Zat Pengatur Tumbuh Kultur Jaringan

Keberhasilan teknik perbanyakan kopi dengan kultur jaringan ditentukan oleh beberapa faktor, salah satunya adalah jenis zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada media kultur. Penyerapan zat pengatur tumbuh berbagai jenis kopi berbeda-beda berdasarkan jenis dan konsentrasi yang diberikan. Perbedaan ini menjadi tantangan penelitian embriogenesis somatik pada tanaman kopi, terutama kopi arabika *Coffea arabica* L. yang menurut beberapa referensi lebih sulit dibandingkan dengan jenis kopi robusta *Coffea canephora* L. (Ibrahim *et al.*, 2012).

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa organik bukan nutrisi pada konsentrasi yang rendah dapat mendorong, menghambat atau secara kualitatif merubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Siregar *et al.*, 2015). 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. Aktivitas zat pengatur tumbuh di dalam pertumbuhan tergantung dari jenis, struktur kimia, konsentrasi, genotipe tanaman serta fase fisiologi tanaman. Dalam proses pembentukan organ

seperti tunas atau akar ada interaksi antara zat pengatur tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam media dengan zat pengatur tumbuh endogen yang diproduksi oleh jaringan tanaman (Lestari, 2011).

Pada metode kultur jaringan tanaman untuk menginduksi kalus diperlukan media dengan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat untuk mendapatkan hasil yang optimal (Junairiah *et al.*, 2018). Zat pengatur tumbuh ada yang berasal dari tumbuhan itu sendiri (zat pengatur tumbuh endogen) dan bersifat alami dan ada juga yang berasal dari luar tumbuhan tersebut dan disebut sintesis (Harahap, 2011). Zat pengatur tumbuh sangat diperlukan sebagai komponen medium bagi pertumbuhan dan diferensiasi sel. Tanpa zat pengatur tumbuh, pertumbuhan eksplan akan terhambat, bahkan mungkin tidak tumbuh sama sekali.

Auksin yang ada pada tanaman jumlahnya sangat sedikit, sehingga perlu ditambah auksin eksogen (Siregar *et al.*, 2015). Auksin didefinisikan sebagai zat tumbuh yang mendorong elongasi jaringan koleoptil pada percobaan-percobaan *bio-assay* dengan *avena* atau tanaman lainnya. Pengaruh Fisiologis dari Auksin secara umum berperan pada berbagai aspek pertumbuhan dan perkembangan tanaman. seperti pembesaran sel, penghambatan mata tunas samping, absisi (pengguguran daun), aktivitas daripada kambium, pertumbuhan akar (Harahap, 2011).

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).

Sitokinin berperan penting dalam pengaturan pembelahan sel dan morfogenesis. Sitokinin yang pertama kali ditemukan adalah kinetin. Kinetin bersama-sama dengan auksin memberikan pengaruh interaksi terhadap diferensiasi jaringan. Pada pemberian auksin dengan konsentrasi relatif tinggi, diferensiasi kalus cenderung ke arah pembentukan primordia akar, sedangkan pada pemberian kinetin yang relatif tinggi, diferensiasi kalus cenderung ke arah pembentukan primordia batang atau tunas (Harahap, 2011).

Perkembangan dan pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh (auksin dan sitokinin). Penggunaan modifikasi zat pengatur tumbuh dapat menjadi faktor penentu keberhasilan kultur jaringan (Juanda *et al.*, 2015). Menurut Yuliarti (2010), jenis hormon yang sering digunakan adalah golongan auksin seperti Indole Acetic Acid (IAA), Napthalene Acetic Acid (NAA), 2,4-D, CPA, dan Indole Acetic Acid (IBA). Sedangkan golongan sitokinin seperti Kinetin, Benziladenin (BA), 2I-P, Zeatin, Thidiazuron, dan PBA. Ada juga hormon golongan giberalin yang memiliki pengaruh mirip dengan auksin yaitu antara lain pada pembentukan akar, seperti GA3.

Zat pengatur tumbuh 2,4-D merupakan auksin yang paling umum digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik (Ibrahim *et al.*, 2012). Menurut Harahap (2010), asam 2,4 diklor asetat (2,4-D) adalah senyawa tanpa ciri-ciri indol tapi mempunyai aktivitas biologis seperti IAA yang mempunyai indol. Hormon 2,4-D adalah auksin yang paling aktif dan dipergunakan sebagai herbisida, pada dosis rendah digunakan untuk induksi kalus. Namun pada

penelitian Zulkarnain (2009) menganjurkan untuk membatasi penggunaan 2,4-D pada kultur *in vitro* karena 2,4-D dapat meningkatkan peluang terjadinya mutasi genetik dan menghambat fotosintesis pada tanaman yang diregenerasikan.

Pada penelitian Safitri *et al.* (2017), induksi kalus dipengaruhi oleh konsentrasi 2,4-D yang digunakan. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang digunakan induksi kalus semakin cepat terjadi. Walaupun demikian tidak semua eksplan yang dikulturkan dapat membentuk kalus. Selain auksin, pemberian zat pengatur tumbuh sitokinin juga berpengaruh terhadap diferensiasi sel dalam proses embriogenesis somatik (Ibrahim *et al.*, 2012). Beberapa jenis sitokinin yang biasa dikombinasikan dengan auksin dalam menginduksi embrio somatik kopi diantaranya adalah BA, kinetin dan 2-ip.

III.5 Ekstrak Tomat sebagai Zat Pengatur Tumbuh Alami

Zat pengatur tumbuh berupa auksin dan sitokinin dapat diperoleh secara alami dari bahan organik seperti ekstrak tomat. Bahan-bahan alami yang digunakan dalam kultur jaringan ini jauh lebih ekonomis dibandingkan ZPT sintetik. Selain harganya yang murah, bahan-bahan tersebut mudah didapat dan bahkan jarang dimanfaatkan (Sari *et al.*, 2019).

Dalam penelitian Perdani *et al.* (2019), menunjukkan kelimpahan buah tomat di Indonesia, yang memiliki potensi untuk dikembangkan salah satunya adalah buah tomat (*Solanum lycopersicum* L.) sangat mudah dijumpai dan sering dimanfaatkan sebagai pelengkap masakan. Berdasarkan data statistik produksi hortikultura tahun 2014, di Indonesia komoditas tomat memiliki luas panen 59.008 Ha, dengan jumlah produksi 915.987 Ton dan rata-rata hasil 15,52 Ton/Ha

Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) merupakan salah satu tanaman sayuran

yang tumbuh dalam semusim (annual), dan tergolong ke dalam suku Solanaceae. Tomat memiliki beberapa ciri yaitu buahnya berwarna merah (masak), memiliki rasa manis dan sedikit keasam-asaman. Tomat memiliki keunggulan kandungan nutrisi bagi kesehatan yang dibutuhkan oleh tubuh manusia (Kailaku *et al.*, 2011). Menurut Dwiyani *et al.* (2009), ekstrak tomat mengandung fosfor, kalsium, besi, kalsium, vitamin C, tiamin, protein 1 gram, vitamin A, dan vitamin K.

Penggunaan ekstrak tomat sebagai zat pengatur tumbuh alami berguna sebagai penyedia nutrisi tambahan seperti mineral, vitamin, asam amino, dan unsur hara lainnya. Komposisi kimia tomat disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi kimia buah tomat *Lycopersicon esculentum* per 100 g

Komposisi Gizi	Jumlah	Satuan
Vitamin A	1500	IU
Vitamin B	60	Mg
Vitamin C	40	Mg
Protein	1	G
Karbohidrat	4,2	G
Lemak	0,3	G
Fosfor	5	Mg
Ferrum	0,5	Mg
Pektin	0,17-0,25	%

Sumber: Anggareni (2012).

Buah tomat yang masak (*fully ripe*) mengandung sitokinin dengan konsentrasi yang rendah, sitokinin dalam buah tomat berkurang seiring masaknyanya buah tomat. Dengan *Amaranthus bioassay*, didapatkan 10.35µg benzylaminopurin/1000g buah tomat hijau dan 0.15 µg benzylaminopurin/1000g buah tomat yang sudah masak merah (Dwiyani *et al.*, 2009). Sehingga pada penelitian ini ekstrak buah tomat digunakan sebagai sumber hormon alami yaitu

hormon golongan sitokinin yang berguna untuk membantu merangsang hormon auksin menginduksi kalus kopi arabika *Coffea arabica* L.

Kandungan sitokinin dalam ekstrak tomat perlu diseimbangkan dengan pemberian auksin sintetik. Menurut Oktaviana *et al.* (2015) dalam kultur *in vitro* auksin dan sitokinin bekerjasama dalam pembelahan sel. Auksin sintetik yang dapat digunakan yaitu 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D).

Fitohormon dalam konsentrasi rendah memiliki efek stimulan yang spesifik pada tanaman, sedangkan pada konsentrasi tinggi memiliki efek menghambat (Dwiyani *et al.*, 2012). Hal ini menjelaskan bahwa konsentrasi ekstrak tomat 100gL^{-1} memberikan hasil terbaik terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus. Sehingga pada penelitian ini merujuk pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Sari *et al.* (2019), menggunakan ekstrak tomat dengan konsentrasi 10%, 15%, dan 20% pada induksi kalus tanaman kentang.

II.6 Kalus Kopi Arabika *Coffea arabica* L.

Penelitian pembentukan kalus pada jaringan terluka pertama kali dilakukan oleh Sinnott pada tahun 1960. Kalus merupakan proliferasi massa sel yang belum terdiferensiasi dan terdiri dari sel yang tidak teratur. Kultur kalus merupakan kultur sekumpulan sel yang tidak terorganisir yang berasal dari berbagai jaringan tumbuhan (Matanari, 2017). Adapun tipe-tipe kalus menurut Fauziyyah *et al.* (2012), yaitu kalus embriogenik, kalus proliferaatif, dan kalus senesen.

Secara *in vivo*, kalus pada umumnya terbentuk pada bekas-bekas luka akibat serangan infeksi mikro organism seperti *Agrobacterium tumefaciens*, gigitan atau tusukan serangga dan nematode. Kalus juga dapat terbentuk sebagai

akibat stress (Siahaan dan Susana, 2016). Kalus yang diakibatkan oleh hasil dari infeksi bakteri *Agrobacterium tumefaciens* disebut tumor.

Menurut Siahaan dan Susana (2016), kalus adalah suatu kumpulan sel amorphous (tidak berbentuk atau belum terdiferensiasi) yang terjadi dari sel-sel jaringan yang membelah diri secara *in vitro* atau di dalam tabung dan tidak terorganisasi sehingga memberikan penampilan sebagai massa sel yang bentuknya tidak teratur. Kalus dapat diperoleh dari bagian tanaman seperti akar, batang, dan daun. Pembentukan kalus pada jaringan luka dipacu oleh zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin endogen. Kalus dapat diinduksi dari eksplan potongan daun yang ditimbulkan pada perlakuan penambahan zat pengatur tumbuh dengan konsentrasi yang relatif lebih tinggi. Eksplan yang digunakan adalah jaringan muda yang memiliki sifat meristematik yang memiliki hormon endogen yang aktif membelah (Mahadi *et al.*, 2014).

Dengan berkembangnya metode kultur *in vitro*, peningkatan variabilitas genetik dapat ditingkatkan melalui variasi somaklonal yang diperoleh dari kultur kalus. Melalui cara ini variasi dapat diperluas karena variasi genotipe dapat terjadi pada tingkat sel, walaupun sifat yang timbul dari variasi-variasi tersebut tidak dapat diperhitungkan secara tepat. Perubahan genetik yang diakibatkan bukan disebabkan oleh segregasi atau rekombinasi gen. Keragaman genetik pada kultur jaringan dapat dicapai melalui fase tak berdiferensiasi (fase kalus dan sel bebas) yang relatif lebih panjang (Siahaan dan Susana, 2016).

Kalus adalah jaringan meristematik yang merupakan wujud dari dediferensiasi. Dalam kultur jaringan menginduksi terbentuknya kalus merupakan langkah yang penting. Setelah terbentuknya kalus baru diberikan perlakuan atau

rangsangan untuk berdiferensiasi membentuk akar atau tunas (Siahaan dan Susana, 2016).

Menurut Murni (2010), secara anatomis dan histologis sel kalus yang dihasilkan dari kultur dapat dibedakan dalam dua tipe. Tipe yang pertama adalah sel yang mempunyai vakuola besar dan banyak, biasanya kurang ampu untuk membentuk embrioid dan tipe kedua adalah sel yang mempunyai sitoplasma banyak, biasanya mampu membentuk embrioid. Umumnya induksi yang terjadi akibat pemberian zat pengatur tumbuh dalam kultur *in vitro* dapat menyebabkan terjadinya pembelahan sel saja sehingga menghasilkan kalus atau induksi yang menyebabkan terjadinya modifikasi gen sehingga sel mengalami morfogenesis dan diferensiasi termasuk embriogenesis somatik. Embrio somatik dicirikan adanya calon akar dan pucuk pada satu sumbu. Embriogenesis somatik pada beberapa eksplan tanaman dapat terjadi secara langsung maupun tidak langsung atau dapat terjadi keduanya pada eksplan yang sama.

Kalus berasal dari pembelahan berkali-kali sel-sel parenkim di sekitar berkas pengangkut dan beberapa elemen penyusun berkas pengangkut kecuali xylem. 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 (ZPT) dan lingkungan tumbuh sehingga eksplan bertambah besar (Safitri *et al.*, 2017). Waktu tumbuh kultur dihitung secara manual dari hari setelah tanam (HST) hingga eksplan membengkak dan muncul kalus.



Gambar 3. Kalus daun kopi arabika *Coffea arabica* L.
Sumber: Ibrahim *et al.* (2012).

Proses inisiasi pembentukan kalus pada dasarnya adalah stimulasi proses dediferensiasi. Proses penting dalam tahapan inisiasi adalah (1) tanggapan sel atau jaringan atau organ terhadap signal hormonal dan atau lingkungan, (2) dediferensiasi, yaitu induksi jaringan dewasa menjadi meristematik kembali yang ditandai dengan kemampuan sel-selnya untuk membelah (bermitosis), dan (3) sifat determinasi, yaitu sel-sel/jaringannya terus berkembang kearah tertentu, menjadi organ atau embrio (Matanari, 2017).

Sedangkan menurut Junairiah *et al.* (2018), pembentukan kalus terjadi akibat adanya perlukaan yang diberikan pada eksplan, sehingga sel-sel pada eksplan akan memperbaiki sel-sel yang rusak tersebut. Awalnya terjadi pembentangan dinding sel dan penyerapan air sehingga sel akan membengkak dan terjadi pembelahan sel. Rangsangan luka tersebut menyebabkan terjadinya kesetimbangan pada dinding sel sehingga sebagian protoplas mengalir ke luar dinding sel dan mulai terbentuk kalus.

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

III.1.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), lemari pendingin (kulkas), blender, *hotplate*, timbangan analitik, erlenmeyer, pH meter, batang pengaduk, gelas ukur, gelas kimia, botol kultur, pinset, gunting, scalpel, mata pisau, cawan petri, bunsen, *sprayer*, pipet tetes, sendok tanduk, ATK, dan kamera.

III.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah eskplan daun kopi arabika *Coffea arabica* L. yang diambil di Toraja Sulawesi Selatan, medium *Murashige and Skoog* (MS) instan, ekstrak tomat, hormon 2,4-D, agar-agar bubuk, sukrosa, akuades, alkohol 70%, alkohol 96, deterjen, 0,2% Dithane M-45, Bayclin 1,5%, asam chloride (HCL 1N), kalium hidroksida (KOH 1N), *Plastic wrapping*, *Cling wrap*, plastik sampel, kertas label, kertas saring, karet gelang, koran, korek api, dan *Tissue*.

III.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 2 faktor, yaitu:

a. Faktor Konsentrasi Ekstrak Tomat (A)

A₀ : Tanpa Ekstrak Tomat

A₁₀ : 10%

A₁₅ : 15%

A₂₀ : 20%

Konsentrasi ekstrak tomat pada penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi yang dilakukan dalam induksi kalus kentang *Solanum tuberosum* L. oleh Sari *et al.* (2019).

b. Faktor Konsentrasi 2,4-D (D)

D₀ : Tanpa 2,4-D

D₁ : 1 ppm

D₂ : 2 ppm

D₃ : 3 ppm

Dengan demikian diperoleh 16 kombinasi perlakuan, yaitu:

A₀D₀ A₁₀D₀ A₁₅D₀ A₂₀D₀

A₀D₁ A₁₀D₁ A₁₅D₁ A₂₀D₁

A₀D₂ A₁₀D₂ A₁₅D₂ A₂₀D₂

A₀D₃ A₁₀D₃ A₁₅D₃ A₂₀D₃

Keterangan:

A₀D₀ : 0% ekstrak tomat + 0 ppm 2,4-D

A₀D₁ : 0% ekstrak tomat + 1 ppm 2,4-D

A₀D₂ : 0% ekstrak tomat + 2 ppm 2,4-D

A₀D₃ : 0% ekstrak tomat + 3 ppm 2,4-D

A₁₀D₀ : 10% ekstrak tomat + 0 ppm 2,4-D

A₁₀D₁ : 10% ekstrak tomat + 1 ppm 2,4-D

A₁₀D₂ : 10% ekstrak tomat + 2 ppm 2,4-D

A₁₀D₃ : 10% ekstrak tomat + 3 ppm 2,4-D

A₁₅D₀ : 15% ekstrak tomat + 0 ppm 2,4-D

A₁₅D₁ : 15% ekstrak tomat + 1 ppm 2,4-D

A₁₅D₂ : 15% ekstrak tomat + 2 ppm 2,4-D

A₁₅D₃ : 15% ekstrak tomat + 3 ppm 2,4-D

A₂₀D₀ : 20% ekstrak tomat + 0 ppm 2,4-D

A₂₀D₁ : 20% ekstrak tomat + 1 ppm 2,4-D

A₂₀D₂ : 20% ekstrak tomat + 2 ppm 2,4-D

A₂₀D₃ : 20% ekstrak tomat + 3 ppm 2,4-D

Jumlah ulangan disetiap perlakuan adalah 3, maka jumlah total botol percobaan seluruhnya adalah 48 botol.

III.3 Prosedur Penelitian

III.3.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel tanaman dilakukan di Toraja, Sulawesi Selatan. Pengambilan sampel berdasarkan metode Defitri (2016), daun kopi arabika *Coffea arabica* L. diambil dari tanaman yang tumbuh subur dengan cara digunting dibagian tangkai daunnya dan dibungkus dalam koran lembab dan simpan di kantong plastik untuk dibawa ke laboratorium untuk diidentifikasi.

III.3.2 Sterilisasi

III.3.2.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan harus dalam keadaan steril. Sebelum di sterilkan menggunakan otoklaf, terlebih dahulu dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air mengalir sampai bersih, kemudian dibungkus dengan kertas, selanjutnya disterilkan ke dalam autoklaf pada temperatur 121°C selama 20 menit. 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.3.2.2 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan berdasarkan metode Ibrahim *et al.* (2012) yang dimofikasi. Daun kopi arabika *Coffea arabica* L. dibersihkan dengan deterjen dan dibilas dengan air mengalir. Daun disterilisasi menggunakan larutan 0,2% Dithane M-45 selama 30 menit, lalu dibilas sampai bersih. Di dalam *laminar air flow*, daun direndam dalam alkohol 70% selama 3-5 menit dilanjutkan dengan perendaman dalam Bayclin 1,5% selama 15 menit. Selanjutnya, daun dibilas sampai bersih dengan akuades steril selama 5 kali pencucian.

III.3.2.3 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.3.3 Pembuatan Larutan Stok

III.3.3.1 Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Tomat

Buah tomat yang sudah dicuci bersih dipotong-potong dan ditimbang sebanyak 100 g dan ditambahkan 100 ml aquadest sehingga memiliki perbandingan 1:1, kemudian diblender sampai halus. Ekstrak tomat dituang ke dalam erlenmeyer selanjutnya disaring menggunakan kertas saring Whatman sehingga diperoleh larutan stok ekstrak tomat dengan konsentrasi 100%. Untuk memperoleh konsentrasi masing-masing ekstrak tomat dalam perlakuan perlu dilakukan pengenceran.

III.3.3.2 Pembuatan Larutan Stok Hormon 2,4-D

Untuk stok hormon 2,4-D, dilakukan dengan cara menimbang bubuk hormon sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dalam akuades steril 100 ml lalu diaduk hingga benar-benar homogen dengan batang pengaduk, lalu dimasukkan ke dalam botol yang diberi label dan disimpan di dalam lemari pendingin. Untuk memperoleh konsentrasi masing-masing ekstrak tomat dalam perlakuan perlu dilakukan pengenceran.

III.3.4 Pembuatan Medium

III.3.4.1 Pembuatan Medium MS

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Murashige and Skoog* (MS) instan. Pembuatan medium 1 L dibutuhkan media MS instan sebanyak 4,43 g. Jadi terlebih dahulu ditimbang media MS sebanyak 4,43 g, dicampurkan dengan sukrosa 30 g/L dan agar-agar 7 g/L, kemudian ditambahkan akuades 1 L. Selanjutnya dilarutkan dalam gelas kimia sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga homogen. Kemudian dimasak di dalam panci hingga mendidih sambil diaduk. Setelah itu, diukur PH-nya diantara 5,7-5,8 (jika medium terlalu basa maka tambahkan HCl 1 N, namun jika medium terlalu asam maka tambahkan KOH 1 N). Selanjutnya, dimasukkan ke dalam panci (diaduk) dan masak hingga medium mendidih.

III.3.4.2 Pembuatan Medium MS + Ekstrak Tomat

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% (A_0), tidak ada penambahan ekstrak tomat. Konsentrasi 10% (A_{10}), medium MS ditambahkan 25 ml larutan stok ekstrak tomat

. Kosentrasi 15% (A₁₅), medium MS ditambahkan 37,5 ml larutan stok ekstrak tomat. Kosentrasi 15% (A₂₀), medium MS ditambahkan 50 ml larutan stok ekstrak tomat. Selanjutnya dilarutkan dalam gelas kimia sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga homogen. Kemudian dimasak di dalam panci hingga mendidih sambil diaduk. Setelah itu, medium dituangkan ke dalam botol kultur yang sudah disiapkan dengan takaran 250 ml untuk 9-10 botol kultur. Sterilisasi medium dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 17,5 psi temperature 121°C selama 15 menit, lalu disimpan di ruang kultur pada suhu 25⁰C sebelum digunakan digunakan untuk menjaga medium tetap steril.

III.3.4.3 Pembuatan Medium MS + 2,4-D

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 kosentrasi 0 ppm 2,4-D (D₀), tidak ada penambahan hormon 2,4-D. Kosentrasi 1 ppm 2,4-D (D₁), medium MS ditambahkan 1 ppm 2,4-D (atau 0,25 ml larutan stok 2,4-D). Kosentrasi 2 ppm 2,4-D (D₂), medium MS ditambahkan 2 ppm 2,4-D (atau 0,5 ml larutan stok 2,4-D). Kosentrasi 3 ppm 2,4-D (D₃), medium MS ditambahkan 3 ppm 2,4-D (atau 0,75 ml larutan stok 2,4-D). Selanjutnya dilarutkan dalam gelas kimia sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga homogen. Kemudian dimasak di dalam panci hingga mendidih sambil diaduk. Setelah itu, medium dituangkan ke dalam botol kultur yang sudah disiapkan dengan takaran 250 ml untuk 9-10 botol kultur. Sterilisasi medium dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 17,5 psi temperature 121°C selama 15 menit, lalu disimpan di ruang kultur pada suhu 25⁰C sebelum digunakan untuk menjaga medium tetap steril.

III.3.4.4 Pembuatan Medium MS + Ekstrak Tomat + 2,4-D

Tabel 2. Pembuatan Medium MS + Ekstrak Tomat + 2,4-D

2,4-D Ekstrak Tomat	1 ppm (0,11 ml)	2 ppm (0,22 ml)	3 ppm (0,33 ml)
10% (11 ml)	10% ekstrak tomat + 1 ppm 2,4-D	10% ekstrak tomat + 2 ppm 2,4-D	10% ekstrak tomat + 3 ppm 2,4-D
15% (16,5 ml)	15% ekstrak tomat + 1 ppm 2,4-D	15% ekstrak tomat + 2 ppm 2,4-D	15% ekstrak tomat + 3 ppm 2,4-D
20% (22 ml)	20% ekstrak tomat + 1 ppm 2,4-D	20% ekstrak tomat + 2 ppm 2,4-D	20% ekstrak tomat + 3 ppm 2,4-D

Untuk memudahkan pembuatan medium dengan 9 taraf konsentrasi yang berbeda, maka medium MS 1.000 ml dibagi menjadi 9 bagian sehingga menjadi 110 ml. Untuk pembuatan medium MS + ekstra tomat + 2,4-D, maka dilakukan penambahan medium MS dengan berbagai konsentrasi ekstrak tomat + 2,4-D (Tabel 2). Selanjutnya dilarutkan dalam gelas kimia sambil diaduk dengan batang pengaduk hingga homogen. Kemudian dimasak di dalam panci hingga mendidih sambil diaduk. Setelah itu, medium dituangkan ke dalam botol kultur yang sudah disiapkan dengan takaran 110 ml untuk 4-5 botol kultur. Sterilisasi medium dengan menggunakan autoklaf pada tekanan 17,5 psi temperature 121°C selama 15 menit, lalu disimpan di ruang kultur pada suhu 25⁰C sebelum digunakan.

III.3.5 Inisiasi Eksplan

Penanaman eksplan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Eksplan yang digunakan adalah daun tanaman *Coffea arabica* L. Daun dilukai dengan

memotong sedikit bagian pangkal, ujung, dan sisi daun dengan pisau gunting. Daun dipotong dengan ukuran 1 cm² dan ditanam ke dalam botol berisi media. Setelah itu botol kultur ditutup kembali dengan *plastic wrapping* dan di *cling wrap*.

III.3.6 Pemeliharaan Eksplan

Botol kultur yang berisi eksplan diletakkan pada rak kultur, dan diinkubasi dalam ruang gelap pada temperatur $\pm 25^{\circ}\text{C}$ dengan kelembaban relatif $\pm 60\%$ selama 2 bulan (Ibrahim *et al.*, 2013). Untuk mengurangi tingkat kontaminasi, dilakukan penyemprotan botol kultur dengan menggunakan alkohol 70% setiap hari sampai eksplan membentuk kalus. Eksplan yang terkontaminasi segera dikeluarkan dari rak kultur.

III.3.7 Parameter Pengamatan

Pada penelitian ini parameter yang akan diamati yaitu:

1. Presentasi kultur yang membentuk kalus (%)

$$\text{Presentasi kultur yang berkalus} = \frac{\text{jumlah eksplan yang berkalus}}{\text{jumlah eksplan seluruh perlakuan}} 100\%$$

2. Waktu tumbuh kalus

Jumlah rata-rata hari yang dibutuhkan eksplan untuk tumbuh kalus pada setiap perlakuan.

3. Berat basah kalus

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

4. Warna kalus

Warna kalus diamati secara visual pada akhir pengamatan penelitian.

5. Tekstur kalus

Tekstur kalus diamati pada pengamatan di akhir penelitian dengan menggunakan mikroskop, untuk melihat apakah kalus yang terbentuk termasuk kalus yang remah (*friable*) atau kompak (*nonfriable*).

III.3.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah analisis kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif diperoleh dari pengamatan secara visual meliputi warna kalus dan tekstur kalus yang dianalisis secara deskriptif. Sedangkan data kuantitatif diperoleh dari persentase eksplan membentuk kalus, pengamatan waktu tumbuh kalus, dan berat basah kalus.

Data kuantitatif yang diperoleh terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui bahwa data berasal dari populasi yang berdistribusi normal. Kemudian dilanjutkan uji homogenitas variannya menggunakan *Test Homogeneity of Variance* untuk mengetahui data yang diperoleh merupakan data homogeny yakni dengan *Levene's Test*. Data berdistribusi normal dan bervariasi homogen jika derajat signifikannya $> 0,05$ yang kemudian dilanjutkan dengan analisis uji parametric yakni ANOVA untuk mengetahui pengaruh kelompok-kelompok perlakuan yang menggunakan uji *Duncan*. Jika derajat signifikansi pada hasil analisis varians menunjukkan $> 0,05$ maka data bervariasi homogen, namun jika data ternyata tidak bervariasi homogen akan dilanjutkan uji *Brown-Forsythe* ($p < 0,05$) dan dilanjutkan uji *Games-Howell*. Jika data tidak berdistribusi normal maka dianalisis menggunakan uji nonparametrik yakni uji *Kruskal-Wallis* ($p < 0,05$) untuk mengetahui ada/tidaknya pengaruh pada setiap perlakuan yang kemudian dilanjutkan dengan uji lanjutan

yakni *Mann-Whitney U*. Pada uji *Kruskal-Wallis*, jika derajat signifikannya $< 0,05$ maka antar perlakuan yang dibandingkan menunjukkan ada pengaruh nyata (Nazir, 1999; Zuraidassanaaz, 2016).