

auksin hadir di media. Kinetin sering digunakan dalam kultur jaringan tanaman untuk menginduksi pembentukan kalus (bersama dengan auksin) dan untuk meregenerasi jaringan tunas dari kalus (dengan konsentrasi auksin lebih rendah) (Khaniyah, 2012). Penambahan 2,4- Dichlorophenoxyacetic- acid dan Kinetin pada medium Murrashige Skoog mempengaruhi persentase eksplan berkalus, tetapi tidak berpengaruh terhadap persentase hidup eksplan, berat basah dan kering kalus pada induksi kalus daun dewa (Nursyamsi, 2010).

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah botol kultur, cawan petri, pipet tetes, gelas ukur, labu ukur, gelas piala, *handspray*, autoklaf, rak kultur, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, mikropipet, pH meter, timbangan analitik, bunsen, pinset, pisau dan *scalpe*, *Laminar Air Flow* (LAF), bunsen, gelas beker, erlenmeyer, ATK, dan kamera, bejana, botol kecil, corong.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah media pertumbuhan kalus tanaman kopirobusta, *Murashige-Skoog* (MS) sintetis, zat pengatur tumbuh 2,4-D dan Kinetin, agar, spiritus, *tissue*, kertas label, *Cling wrap*, plastik sampel, korek api.

III.2 Rancangan Penelitian

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

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

A0 : Tanpa Perlakuan

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

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

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

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

B0 : Tanpa Perlakuan

B1 : Perlakuan dengan penambahan Kinetin 0,5 ppm

B2 : Perlakuan dengan penambahan Kinetin 1 ppm

B3 : Perlakuan dengan penambahan Kinetin 1,5 ppm

Kombinasi perlakuan akan disajikan pada tabel 3.1 sebagai berikut :

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

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

Kombinasi dari kedua faktor diatas menghasilkan 16 kombinasi perlakuan yang sedang diulang sebanyak 3 kali pengulangan, maka jumlah total botol percobaan seluruhnya yang didapatkan sebesar 48 data. Setiap botol kultur masing-masing 1 eksplan.

III.3 Prosedur Penelitian

1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan selama penelitian harus dalam keadaan steril. Sebelum disterilkan menggunakan *autoklaf*, alat-alat berupa gelas dan logam terlebih dahulu dicuci menggunakan deterjen dan kemudian dibilas menggunakan air mengalir sampai bersih, kemudian dibungkus dengan plastik. Adapun alat-alat gelas, alat-alat logam dan aquades disterilkan menggunakan *autoklaf* selama 60 menit dan media pertumbuhan selama 15 menit pada suhu 121 °C. Alatpenanaman yang telah disterilkan menggunakan *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.

2. Sterilisasi Ruang Kerja

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

3. Sterilisasi Eksplan

Daun-daun muda kopi robusta *Coffea canephora* L. diambil dan dicuci dengan detergen kemudian dikocok lalu dibilas menggunakan air mengalir hingga bersih, lalu dibilas dengan aquades. Kemudian, direndam di dalam cairan fungisida yang mengandung bahan aktif Mankozeb 80% yang memiliki konsentrasi 0,25% selama 15 menit, lalu dibilas sampai bersih. Sterilisasi selanjutnya dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF) kemudian, disterilisasi menggunakan cairan alkohol 70% selama 3 menit dan direndam dengan *Klorin* 0,25% dan 0,35% secara bertahap selama 7 menit, kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali selama 5 menit. Setelah itu, dicelupkan pada cairan alkohol 70% selama 30 detik dan dibilas dengan aquades sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit.

III.4 Pembuatan Larutan

1. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) + Pembuatan Larutan Media MS

Media *Murashige-Skoog* (MS) instan pertama-tama ditimbang sebanyak 4,43 gr/L, gula 30 gr/L, dan agar 7 gr/L. Setelah ketiganya ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam gelas beker setelah itu, ditambahkan hormon Zat Pengatur

tumbuh (ZPT) 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) sebanyak 2 mg dan Kinetin sebanyak 0,5 mg ke dalam gelas beker lalu ditambahkan larutan aquades steril sebanyak 1L.

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

Agar pembuatan medium lebih mudah dilakukan dengan 4 taraf konsentrasi yang berbeda, dimana medium Murashige-Skoog (MS) 1 L dibagi menjadi 4 bagian, menjadi 250 ml untuk setiap bagian. Untuk konsentrasi 0 ppm 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) (A_0), tidak ada penambahan hormon 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*). Konsentrasi 1 ppm 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) (A_1), Medium MS ditambahkan 1 ppm 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) (0,25 ml larutan stok 2,4-D). Konsentrasi 2 ppm 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) (A_2), Medium MS ditambahkan 2 ppm 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) (0,5 ml larutan stok 2,4-D). Konsentrasi 3 ppm 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) (A_3), Medium Murashige-Skoog (MS) ditambahkan 3 ppm 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) (0,75 ml larutan stok 2,4-D). Sedangkan untuk medium Murashige-Skoog (MS) ditambahkan hormon Kinetin dibagi juga menjadi 4 bagian, sehingga menjadi 250 ml. Untuk konsentrasi 0 ppm Kinetin (B_0), tidak ada penambahan hormon Kinetin. Konsentrasi 0,5 ppm Kinetin (B_1), Medium Murashige-Skoog (MS) ditambahkan 0,5 ppm Kinetin (0,125 ml larutan stok Kinetin). Konsentrasi 1 ppm Kinetin (B_2), stok Kinetin). Pada konsentrasi 1,5 ppm Kinetin (B_3), Medium Murashige-Skoog (MS) ditambahkan 1,5 ppm Kinetin (0,375 ml larutan stok Kinetin). Setelah itu, dilarurkan ke dalam gelas kimia menggunakan *magnetic stirrer* dan diletakkan diatas *hotplate* sampai homogen. kemudian, medium dituang ke dalam botol

kultur yang telah disiapkan dengan ukuran 250 ml untuk 8-10 botol kultur. Selanjutnya, sebelum botol kultur digunakan, dilakukan sterilisasi medium menggunakan autoklaf pada tekanan 17,5 psi pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu di simpan di ruang kultur pada suhu 25°C.

3. Pembuatan Medium MS + 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) + Kinetin

Tabel 2. Pembuatan Medium MS+2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*)+Kinetin

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

Untuk pembuatan medium yang lebih mudah dilakukan dengan 9 taraf konsentrasi yang berbeda, maka medium MS 1 L dibagi menjadi 4 bagian sehingga menjadi 250 ml untuk setiap bagiannya. Dalam pembuatan medium MS + 2,4-D + Kinetin, lakukan penambahan medium MS dengan berbagai konsentrasi 2,4-D + Kinetin seperti pada Tabel. 2 diatas. Kemudian, dilarutkan menggunakan gelas kimia dan *magnetic stirrer* kemudian diletakkan diatas *hot plate* sampai semuanya homogen. Selanjutnya, larutan yang telah homogen tadi dituang ke dalam botol yang telah disiapkan dengan takaran botol masing-masing

sebesar 250 ml untuk 5-10 botol kultur. Sterilisasi medium dilakukan dengan cara menggunakan autoklaf yang memiliki tekanan sebesar 17,5 psi dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian disimpan di ruang kultur pada suhu 25°C

4. Penanaman Eksplan

Penanaman eksplan atau penanaman kalus ini dilakukan dengan menggunakan *Laminar Air Flow* (LAF) dengan memperhatikan kondisi yang aseptik. Eksplan yang telah steril kemudian dipotong dengan ukuran $\pm 1 \text{ cm}^2$ menggunakan pisau *scalpel*. Setelah eksplan dipotong selanjutnya dilakukan proses penanaman dimana eksplan tersebut ditanam pada botol yang telah berisikan media MS yang telah dicampurkan dengan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) dan kinetin dengan posisi daun dalam keadaan telungkup, kemudian pada setiap botol kultur diisi dengan masing-masing satu eksplan yang akan dilakukan penelitian. Setelah itu, botol kultur ditutup menggunakan *aluminium foil* dan *cling wrap*. Pada tahap akhir, botol kultur yang telah ditutup tadi disimpan di ruang inkubasi pada suhu $\pm 25^\circ\text{C}$ dengan kelembaban relative 60% dalam kurung waktu 2 bulan.

III.4 Pemeliharaan Eksplan

Sebelum penelitian dimulai, penyemprotan botol-botol kultur dilakukan dengan cara dibungkus dengan menggunakan kertas sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf dan pemeliharaan ini bertujuan menjaga kebersihan secara aseptis, memisahkan botol yang terkontaminasi oleh mikroorganisme dari ruang inkubasi.

1. Hari Munculnya 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 intermediet. Sebelum kalus muncul dilakukan pengamatan setiap hari dengan menghitung hari saat kalus mulai muncul pertama kali yang telah dinyatakan dalam Hari Setelah Tanam (HST). Kalus yang mulai muncul tersebut ditandai dengan adanya pembengkakan atau munculnya suatu jaringan yang dapat ditandai dengan adanya warna.

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

- $$\text{Persentase eksplan berkalus} = \frac{\text{Eksplan berkalus tiap perlakuan}}{\text{Total eksplan tiap perlakuan}} 100\%$$

2. Warna Kalus

Kalus memiliki berbagai macam warna yang dapat dilihat pada akhir penelitian dimana pengamatan warna kalus ini ditandai secara visual. Warna-warna kalus sangat beragam, seperti warna putih bening, putih kecoklatan, putih kekuningan, kuning, kuning kecoklatan, coklat, coklat kehitaman dan hitam.

3. Tekstur Kalus

Tekstur kalus ini diamati pada akhir penelitian dengan cara visual, seperti mengamati karakteristik dari bagian-bagian kalus tersebut. Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi dua bagian , yaitu ada yang memiliki tekstur remah (permukaan kalus tidak mengkilap dan bergelombang) dan juga ada kalus yang memiliki tekstur

4. Persentase Eksplan yang Hidup

Eksplan diamati setiap hari dari awal penanaman hingga akhir penelitian. Eksplan yang hidup, yaitu eksplan yang mampu membentuk tunas baru dan eksplan yang hidup tetapi tidak berkembang (statis).

$$\bullet \text{ Persentase jumlah eksplan hidup} = \frac{\text{Jumlah eksplan hidup}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

5. Berat Basah Tunas atau Kalus

Berat basah tunas atau kalus dihitung pada akhir pengamatan (60 HST) dengan cara ditimbang terlebih dahulu menggunakan timbangan analitik. Kalus yang akan ditimbang adalah kalus yang telah dibersihkan dari sisa-sisa media.

6. Analisis Data

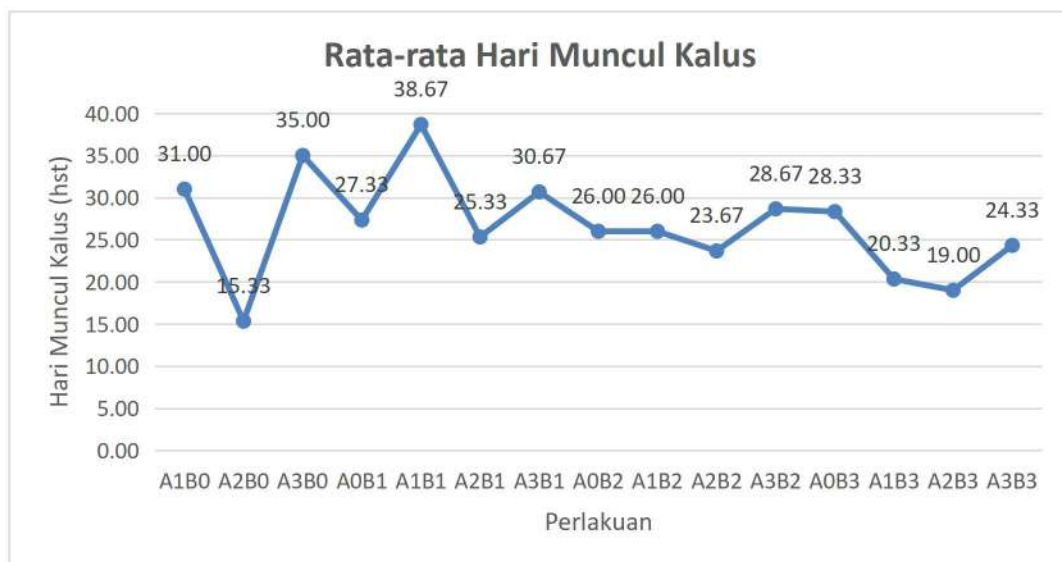
Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) kemudian jika memberikan pengaruh nyata dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hari Munculnya Kalus

Pengamatan hari munculnya kalus telah dilakukan dengan menghitung hari saat kalus muncul pertama kali yang dinyatakan dalam hari setelah tanam (HST). Data rata-rata hari munculnya kalus untuk setiap perlakuan disajikan dalam bentuk grafik pada gambar berikut :



Gambar 3. Grafik Rata-rata Hari Munculnya Kalus Kopi Robusta *Coffea canephora* L.

Berdasarkan gambar 3 diatas, telah ditunjukkan bahwa rata-rata munculnya kalus kopi robusta *Coffea canephora* L. dengan penambahan hormon 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) dan kinetin (*6-furfuryl amino purine*) menunjukkan bahwa pada kombinasi 2,4-D 2 ppm + kinetin 0 ppm merupakan hari muncul kalus tercepat pada perlakuan A2B0 dengan memberikan nilai rata-rata yaitu sebesar 15.33 dan kombinasi perlakuan A1B1 merupakan hari muncul

kalus terlama dengan nilai rata-rata yaitu sebesar 38.67. Hal ini dapat menunjukkan, bahwa perlakuan A2B0 memberikan hasil yang paling baik untuk pertumbuhan kalus kopi robusta *Coffea canephora* L. Pernyataan ini didukung oleh penelitian Maulana, dkk., (2019), bahwa perlakuan 2,4-D konsentrasi 2 ppm menunjukkan pertumbuhan paling cepat. Oleh karena itu, dengan adanya pemberian hormon 2,4-D dapat menumbuhkan kalus pada eksplan daun.

Pada perlakuan A1B0, A2B0, dan A3B0 tidak ada penambahan hormon sitokinin tetapi kalus tetap mengalami pertumbuhan, hal ini dikarenakan hormon endogen mampu menghasilkan kalus tetapi tidak mampu bertahan lama karena jumlah hormon endogen yang dimiliki oleh tanaman tidak terlalu banyak dan tidak tersedia secara eksogen. Pada penelitian ini juga ada beberapa perlakuan yang tanpa pemberian auksin juga dapat tumbuh, hal ini dikarenakan secara endogen mampu menghasilkan sitokinin alami sehingga tetap tumbuh tetapi tidak berangsur lama dan mati karena sel tidak mampu mempertahankan sel kalus dengan konsentrasi hormon sitokinin endogen yang sedikit.

Menurut Klaus dan Heansch (2007), kombinasi tanpa 2,4-D tidak menunjukkan adanya embriogenesis somatik dan 2,4-D merupakan ZPT terbaik untuk menginduksi kalus. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan semakin meningkat laju pertumbuhan kalus, menaikkan tekanan osmotik, meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, menyebabkan pengurangan tekanan pada dinding sel, meningkatkan sintesis protein, meningkatkan plastisitas dan pengembangan dinding sel.

Menurut Wardani *et al.*, (2004), plasitisitas dan pengembangan dinding sel didorong oleh pemberian auksin karena auksin mengeluarkan H^+ ke dalam

dinding sel dan H^+ ini menyebabkan pH dinding sel menurun sehingga terjadi pelonggaran struktur dinding sehingga terjadi pertumbuhan. Pelonggaran dinding sel terjadi karena pH yang rendah mengaktifkan enzim yang mematahkan ikatan-ikatan antara polisakarida pembatas pada dinding sel, kemudian sel akan tumbuh lebih cepat karena adanya kenaikan tekanan turgor.

Hasil analisis uji statistik *Analysis of Variance* (ANOVA) menunjukkan bahwa hari munculnya kalus pada berbagai konsentrasi dengan pemberian hormon 2,4-D dan kinetin tidak berbeda nyata disetiap perlakuannya sehingga proses analisis secara statistik tidak dilanjutkan pada uji DMRT taraf 5% (Lampiran 2).

Menurut Roliana V. P., dkk., (2017), pertumbuhan kalus dimulai di sekitar irisan daun. Kalus yang terbentuk pada eksplan disebabkan adanya sel-sel yang kontak dengan medium menjadi meristematik dan menjadi aktif membelah seperti jaringan penutup luka sebagai respon terhadap perlukaan. Mula-mula terjadi pembentangan dinding sel dan terjadi penyerapan air sehingga sel akan membengkak selanjutnya akan terjadi pembelahan sel dan terbentuk kalus.

Menurut George & Sherrington (1984) serta Evans, dkk., (1981), permulaan pertumbuhan kalus dimulai dengan terbentuknya respon terhadap pola pembentukan kalus yang tumbuh pada sisi eksplan bekas pemotongan daun yang bersinggungan langsung dengan medium. Hal ini diduga bahwa pada eksplan daun sitokinin dan auksin tidak dapat diserap melalui permukaan daun, tetapi hanya dapat diserap oleh jaringan pada tepi daun yang bersentuhan langsung dengan medium. Kedua ZPT tersebut tidak ditranslokasikan ke seluruh jaringan daun. Hal yang sama terjadi pada kultur kopi robusta *Coffea canephora* L. bahwa kalus hanya terbentuk pada bagian tepi daun (Arimarsetiowati, 2011).

Perbedaan laju pertumbuhan kalus selain dipengaruhi oleh peningkatan kecepatan pembelahan sel karena pengaruh pemberian hormon juga dipengaruhi oleh genetik, umur jaringan dan jenis tanaman serta faktor lingkungan yang meliputi cahaya, kandungan oksigen, suhu dan kelembaban udara serta kemampuan jaringan menyerap zat-zat hara yang tersedia (Mahadi *et al.*, 2016).

Kemampuan eksplan dalam hal pembentukan kalus, selain disebabkan oleh pengaruh Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) endogen, juga dipengaruhi oleh genotip eksplan, lingkungan dari kultur, umur eksplan dan respon setiap eksplan (Ariani, dkk., 2016). Efektivitas dari Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang digunakan bergantung pada konsentrasi hormon endogen yang berinteraksi dengan hormon eksogen. Penggunaan konsentrasi Zat Pengatur tumbuh (ZPT) dalam jumlah yang seimbang antara auksin dan sitokinin akan menstimulasi eksplan membentuk kalus. Apabila konsentrasi yang diberikan tidak seimbang, induksi kalus makin terhambat. Penggunaan hormon 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) pada konsentrasi rendah akan lebih baik dalam menginduksi kalus dibanding konsentrasi tinggi. Hal ini dikarenakan hormon 2,4-D mempunyai sifat fitotoksitas yang sangat tinggi, bila konsentrasinya berlebihan dalam suatu tanaman (Roliana V.P., dkk., 2017).

Perbedaan respon suatu eksplan juga dapat disebabkan oleh beberapa faktor genotip eksplan, jenis eksplan dan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) media tanam. Pembentukan konsentrasi yang tepat penting untuk mendapatkan respon optimum pada bagian eksplan. Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang terlalu rendah tidak memunculkan respon induksi yang berarti dengan konsentrasi yang terlalu tinggi justru menjadi toksik bagi tanaman (Ariani, dkk., 2016).

IV.2 Warna Kalus Daun Kopi Robusta *Coffea canephora* L.

Hasil pengamatan terhadap parameter warna kalus kopi robusta *Coffea canephora* L. kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) 2,4-D dan kinetin pada media MS secara *in vitro* pada tabel 3.

Tabel 3. Warna Kalus pada Kombinasi 2,4-D dan Kinetin pada 9 MST (Minggu Setelah Tanam).

Pengaruh 2,4-D	Pengaruh Kinetin			
	0 ppm	0,5 ppm	1 ppm	1,5 ppm
0 ppm	-	Putih kekuningan, Coklat,	Putih kekuningan, Coklat,	Putih kekuningan, Putih.
1 ppm	Putih kekuningan,	Putih kekuningan, Putih,	Kuning kecoklatan, Coklat	Putih kecoklatan,
2 ppm	Putih kecoklatan,	Putih kekuningan, Kuning kecoklatan	Kuning kecoklatan, Coklat	Kuning kecoklatan, Putih
3 ppm	Kuning kecoklatan, Putih	Kuning kecoklatan, Putih kekuningan,	Coklat, Putih	Kuning kecoklatan, Coklat



(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 4. Warna kalus kopi robusta *Coffea canephora* L. a) Kalus berwarna putih kekuningan, b) Kalus berwarna putih kecokelatan, c) Kalus berwarna putih, d) Kalus berwarna cokelat.

Berdasarkan dari tabel 3 diatas, menunjukkan bahwa kalus yang terbentuk memiliki warna yang bervariasi, mulai dari putih, putih kekuningan, putih kecokelatan, coklat dan kuning kecokelatan dapat dilihat dari gambar 4.

Hasil penelitian menunjukkan warna kalus yang terbentuk pada minggu ke empat setelah kultur hingga minggu ke sembilan berwarna putih dan setelah itu berubah perlahan-lahan menjadi warna coklat. Sesuai dengan hasil penelitian Ibrahim *et al.*, (2013), menyatakan bahwa kalus kopi dapat dikelompokkan menjadi tiga, yaitu kalus yang berwarna kekuningan, putih kekuningan dan putih. Kalus yang berwarna kekuningan dan juga putih kekuningan merupakan kalus embriogenik yang ditandai dengan struktur kalus kering, berwarna putih susu, mengkilat dan mudah dipisahkan. Kalus dengan warna kekuningan diduga merupakan pigmen antoxantin, pigmen antoxantin ini adalah senyawa fenol dari kelompok flavonoid (Hayati *et al.*, 2010). Hal ini didukung oleh Fadilah, dkk., (2020), bahwa pigmen antoxantin adalah pigmen zat alami pada tumbuhan yang memberikan zat warna kuning. Pigmen ini termasuk kelompok flavonoid yang mengandung dua cincin benzena yang dihubungkan dengan tiga atom karbon serta dirapatkan oleh sebuah atom oksigen. Flavonoid ini ternyata bersifat larut dalam air.

Kalus yang berwarna putih merupakan massa atau kumpulan sel yang masih terus aktif membelah dan dapat membentuk kalus lebih banyak. Ariati *et al.*, (2012), menyatakan kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embriogenik yang memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Menurut Fatmawati (2008), warna kalus mengindikasikan keberadaan klorofil dalam jaringan, semakin hijau

warna kalus semakin banyak pula kandungan klorofilnya. Warna terang atau putih dapat mengindikasikan bahwa kondisi kalus masih cukup baik. Pernyataan ini diperkuat oleh Imam Mahadi, dkk., (2016), bahwa warna pigmen putih dan kuning pada kalus menunjukkan bahwa pertumbuhan kalus tersebut baik serta tidak mudah terjadi oksidasi zat fenolik dan juga sel-selnya mudah berkembang biak.

Kalus dengan warna kecokelatan merupakan kalus yang non embriogenik kalus tersebut tidak memiliki kemampuan untuk beregenerasi. Proses pelukaan yang diberikan pada eksplan diduga menjadi faktor yang mempengaruhi eksplan mengalami pencoklatan. Respon pencoklatan ini terjadi karena adanya interaksi yang terjadi antara eksplan dengan media pada waktu yang berbeda-beda. Respon ini menandakan dua kemungkinan, pertama adalah menunjukkan respon yang mengarah ke pembentukan kalus. Hal ini sesuai dengan Kartika *et al.*, (2014), pertumbuhan kalus diawali dengan mencokelatnya tepi daun. Kedua adalah respon menunjukkan kerusakan sel yang mengarah pada kematian sel. Diduga kemungkinan yang terjadi pada eksplan adalah yang mengarah pada kematian sel.

Kalus yang memiliki rentang warna cenderung coklat berarti kualitas kalus kurang baik. Hal ini dinyatakan oleh Adriani, dkk., (2022), bahwa pencoklatan (*browning*) disebabkan oleh penggunaan bahan tanam yang tidak meristematik, proses sterilisasi yang berlebihan, dan lingkungan yang kurang mendukung. Luka pada eksplan mengakibatkan enzim dan substrat keluar dari sel dan terjadi ikatan antara hidrogen dengan protein diikuti dengan meningkatnya aktivitas Fenilalanin Amonia Liase (PAL) menyebabkan adanya pencoklatan.

Perbedaan kondisi kecokelatan atau browning pada eksplan disebabkan

oleh senyawa fenol yang terakumulasi pada sel kemudian mengalami oksidasi. Hutami (2008) menjelaskan bahwa pencokelatan terjadi diakibatkan oleh enzim oksidase yang mengandung senyawa fenol yang disintesis dalam kondisi oksidatif ketika diberikan pelukaan. Luka pada eksplan mengakibatkan terjadinya enzim dan substrat keluar dari sel kemudian terjadi ikatan antara hidrogen dengan protein yang diikuti dengan meningkatnya aktivitas Fenilalanin Amonia Liase (PAL) yang memproduksi fenilpropanoid yang menyebabkan adanya pencokelatan.

Indikator pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* berupa warna kalus yang menggambarkan penampilan visual sehingga dapat diketahui bahwa suatu kalus masih memiliki sel-sel yang masih aktif membelah atau telah mati. Pada penelitian ini pengamatan warna kalus menunjukkan variasi warna yang terjadi pada kalus dengan tingkat perkembangan yang berbeda-beda. Hal ini pula yang dipengaruhi oleh konsentrasi zat pengatur tumbuh 2,4-D dan Kinetin yang digunakan.

Hasil penelitian menunjukkan penambahan konsentrasi hormon 2,4-D yang semakin tinggi, menghasilkan kalus warna putih kekuningan hingga warna kuning kecokelatan. Hal ini sesuai dengan Isra, dkk., (2020), bahwa dengan adanya peningkatan penambahan konsentrasi hormon 2,4-D dapat menghasilkan kalus yang berwarna putih kekuningan yang menandakan kalus tersebut dapat mengikuti pola embriogenik, serta belum mengalami oksidasi oleh senyawa fenol pada eksplan. Begitupula penambahan konsentrasi hormon kinetin yang lebih tinggi, menghasilkan warna putih hingga putih kekuningan. Hal ini sesuai dengan Ramadhani, dkk., (2023), bahwa dengan adanya peningkatan penambahan

konsentrasi hormon kinetin, dapat menghasilkan warna putih hingga putih kekuningan pada kalus. Hal ini diduga, warna putih pada kalus belum mengandung kloroplas dan memiliki kandungan butir pati yang tinggi.

IV.3 Tekstur Kalus Daun Kopi Robusta *Coffea canephora* L.

Hasil pengamatan terhadap parameter tekstur kalus yang terbentuk dari kombinasi hormon 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) dan Kinetin (*Furfuryl Amino Purine*) pada media MS secara *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Tekstur Kalus pada Kombinasi 2,4-D dan Kinetin pada 9 Minggu Setelah Tanam.

Pengaruh 2,4-D	Pengaruh Kinetin			
	0 ppm	0,5 ppm	1 ppm	1,5 ppm
0 ppm	-	Remah	Remah	Remah
1 ppm	Remah, Kompak	Remah, Kompak	Remah, Kompak	Remah, Kompak
2 ppm	Remah, Kompak	Remah, Kompak	Remah, Kompak	Remah, Kompak
3 ppm	Remah, Kompak	Remah, Kompak	Remah, Kompak	Remah, Kompak



(a)



(b)

Gambar 5. a). Tekstur Kalus Remah dan b). Tekstur kalus kompak

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tekstur kalus yang terbentuk terdiri dari tekstur remah dan kompak (Tabel 4). Tekstur kalus diamati setelah kalus berumur 9 minggu setelah kultur. Tekstur kalus yang terbentuk menunjukkan adanya variasi yang disebabkan oleh pengaruh perlakuan zat pengatur tumbuh

2,4-D dan kinetin yang diberikan dengan konsentrasi yang berbeda. Hal ini sesuai dengan penelitian Ariani, dkk., (2016), bahwa kalus yang terbentuk pada media tanam dengan adanya penambahan hormon auksin dan sitokinin, rata-rata bertekstur kompak dan remah. hal ini karena kalus kompak membentuk lignifikasi sehingga kalus bertekstur keras (Mahadi,2016).

Pengamatan pada tekstur kalus remah ini dapat dilakukan secara visual tanpa menggunakan alat bantu apapun seperti, mikroskop. Tekstur kalus dapat dikatakan baik atau tidak bergantung pada tujuan penggunaan kalus tersebut. Penggunaan kalus secara umum dibedakan atas dua bagian fungsi yaitu sebagai perbanyak tanaman dan sebagai penghasil metabolit sekunder. Hal ini sesuai dengan Indah (2013) bahwa kalus yang baik untuk digunakan sebagai penghasil metabolit sekunder adalah kalus yang memiliki tekstur kompak, karena tekstur kompak dianggap mengandung bahan metabolit sekunder lebih banyak dibanding kalus remah dan intermediet, sedangkan kalus remah untuk perbanyak tanaman.

Hasil pengamatan tekstur kalus secara keseluruhan didominasi oleh kalus yang bertekstur remah. Kalus yang bertekstur remah dipicu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang telah timbul membentuk kalus tersebut (Widyawati dan Geningsih, 2010). Auksin memiliki peran terhadap pembentukan kalus remah. Hormon auksin sintetis, yaitu 2,4-D menstimulasi pemanjangan sel dengan cara penambahan plastisitas dinding sel menjadi longgar, sehingga air dapat masuk ke dalam dinding sel dengan cara osmosis dan sel akan mengalami pemanjangan. Oleh karena itu kalus yang bertekstur remah mengandung banyak air karena belum mengalami lignifikasi

dinding sel, sehingga antara kumpulan sel yang satu dengan yang lain relatif mudah untuk dipisahkan (Nisak, dkk., 2012).

Kalus dengan tekstur remah baik untuk kultur suspensi karena memiliki sel tunggal yang mudah dipisahkan. Kalus yang bertekstur remah memudahkan upaya perbanyakan jumlah massa kalus melalui kultur suspensi. Hal ini sesuai dengan Yelnitis (2012) bahwa kalus remah baik untuk kultur suspensi dalam upaya perbanyakan massa sel.

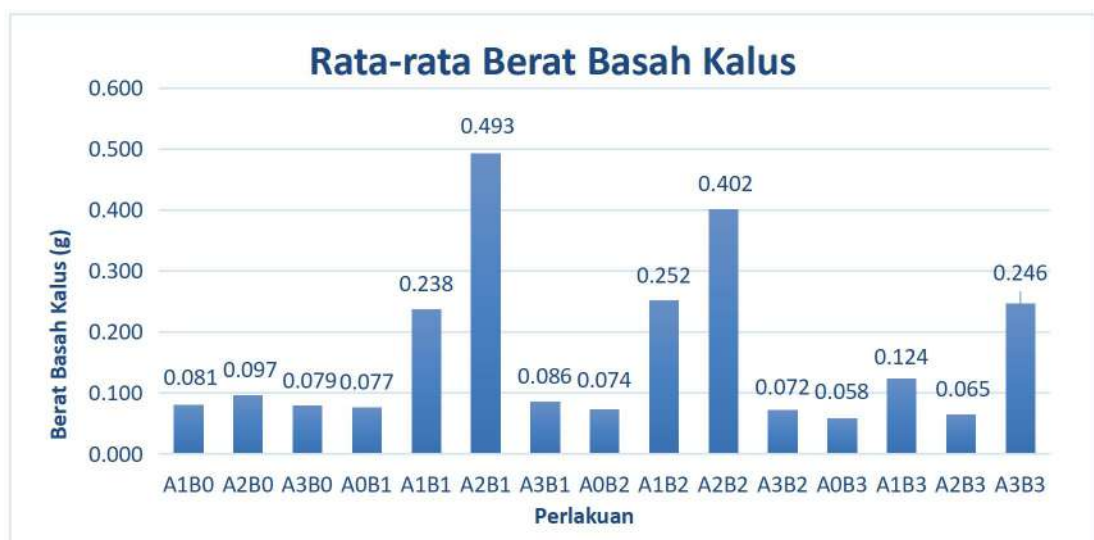
Setiap kalus memiliki potensi yang berbeda dalam membentuk embriosomatik. Eksplan yang membentuk kalus yang berpotensi membentuk embriosomatik adalah kalus yang bersifat embriogenik yaitu kalus yang bertekstur *friable* atau remah serta mudah dipisahkan menjadi fragmen-fragmen yang kecil. Kalus yang tidak potensial dalam membentuk embriosomatik adalah kalus yang kompak atau keras, berbentuk granul serta sulit dipisahkan. Kalus dengan potensi embriogenik biasanya melalui fase pendewasaan yang singkat kemudian memasuki fase embriogenik, sedangkan kalus yang kompak hanya mengalami pembesaran tetapi tidak membentuk embriosomatik (Khozin, dkk., 2022).

Tekstur kalus yang kompak merupakan kalus yang tersusun atas sel-sel berbentuk nodular, dengan struktur yang padat, sulit untuk dipisahkan dan mempunyai vakuola yang besar di dalam selnya serta tidak memiliki ciri embriogenesis somatik. Hal ini sesuai dengan Rivai *et al.*, bahwa kalus kompak tidak pernah ada yang berkembang menjadi embrio somatik, namun kalus kompak tersebut berpotensi untuk berkembang ke arah organogenesis (pembentukan nodul dan tunas). Menurut Ariati *et al.*, (2012) kalus kompak cenderung mengalami pembelahan sel yang lebih lambat jika dibandingkan dengan kalus yang remah

Kalus yang bertekstur kompak disebabkan adanya perbedaan kemampuan jaringan tanaman dalam menyerap unsur hara dan zat pengatur tumbuh dalam media inisiasi.

IV.4 Berat Basah Kalus Daun Kopi Robusta *Coffea canephora* L.

Pengamatan berat basah kalus dilakukan dengan 9 minggu setelah tanam dengan cara ditimbang menggunakan timbangan analitik. Data rata-rata untuk berat basah kalus setiap perlakuan disajikan dalam bentuk grafik pada gambar berikut :



Gambar 6. Grafik Rata-Rata Berat Basah Kalus pada 9 Minggu Setelah Tanam

Berdasarkan gambar 6, ditunjukkan bahwa kombinasi perlakuan A2B1 menghasilkan rata rata berat basah kalus yang paling besar yaitu 0.49 g. Dari grafik diatas juga ditunjukkan bahwa perlakuan A0B3 menunjukkan rata rata berat basah kalus yang terkecil adalah 0.05 gram.

Data berat basah kalus selanjutnya dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengetahui bagaimana konsentrasi pada hormon 2,4-D dan kinetin yang terbaik untuk berat basah kalus kopi robusta

Coffea canephora L. Hasil analisis uji statistik ANOVA (Lampiran 2) menunjukkan bahwa pengamatan berat basah kalus pada berbagai konsentrasi penambahan hormon 2,4-D dan Kinetin berbeda nyata (signifikan), hal ini ditandai dengan nilai signifikan untuk penambahan hormon 2,4-D, hormon kinetin, dan kombinasi antar 2 hormon tersebut memiliki nilai signifikan < 0.05 .

Kemudian untuk mengetahui perbedaan antara pengaruh dari masing-masing perlakuan terhadap perubahan berat basah kalus, maka dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) taraf 5%. Hasil analisis uji lanjut DMRT disajikan pada tabel berikut.

Tabel 5. Hasil Uji Lanjut DMRT pada Berat Basah Kalus.

Perlakuan	Rerataan Berat Basah Kalus
A0B0	0.000000 ^a
A0B1	0.0765667 ^{ab}
A0B2	0.0737000 ^{ab}
A0B3	0.0584000 ^{ab}
A1B0	0.0806333 ^{ab}
A1B1	0.2376667 ^{bc}
A1B2	0.2518000 ^{bc}
A1B3	0.1240000 ^{ab}
A2B0	0.0965000 ^{ab}
A2B1	0.4932000 ^d
A2B2	0.4018000 ^{cd}
A2B3	0.0649667 ^{ab}
A3B0	0.0791333 ^{ab}
A3B1	0.0859667 ^{ab}
A3B2	0.0718000 ^{ab}
A3B3	0.2463667 ^{bc}

Berdasarkan hasil uji DMRT pada tabel 5 diatas, diperoleh bahwa pada perlakuan A2B1 (2,4-D 2 ppm + Kinetin 0,5 ppm) memberikan hasil yang berbeda nyata terhadap seluruh perlakuan yang ada dengan nilai rata-rata berat kalus

sebesar 0.4932000. Hal ini karena pada hasil uji duncan diperoleh perlakuan A2B1 terdapat pada kolom subset yang berbeda dibandingkan variabel lainnya (lampiran 3).

Berdasarkan hasil uji duncan pada tabel diatas juga ditunjukkan bahwa pada perlakuan A0B1, A0B2, A0B3, A1B0, A1B3, A2B0, A2B3, A3B0, A3B1, dan A3B2 memberikan hasil yang tidak berbeda nyata antara perlakuan tersebut. Selain itu, Hasil tidak berbeda nyata juga ditunjukkan pada perlakuan A1B1, A3B3, dan A1B2, hal ini dikarenakan dari hasil uji duncan untu perlakuan tersebut menempatkan kolom subset yang sama pada (lampiran 3).

Hasil pengamatan mengenai pengaruh pemberian konsentrasi kinetin terhadap pertumbuhan kalus robusta *Coffea canephora* L. memberikan hasil terbaik pada perlakuan A2B1 dengan berat basah kalus 0.49 gr. Sesuai dalam jurnal Indah (2013), bahwa pemberian sitokinin berperan penting dalam memicu pertumbuhan kalus. Hasil tersebut sama dengan hasil yang ditunjukkan pada Musdalifa (2017) yang menghasilkan perlakuan kinetin terbaik pada konsentrasi 0.5 ppm.

Hasil terendah ditunjukkan pada perlakuan A0B3 sebesar 0.05 gram. Hal ini sesuai dengan Mastuti *et al.*, (2020), bahwa pemberian konsentrasi auksin dan sitokinin yang kurang tepat dapat mengakibatkan pertumbuhan kalus menjadi lebih lambat. Pertumbuhan kalus yang lambat dikarenakan eksplan lebih terfokus pada produksi metabolit sekunder dibandingkan dengan pertumbuhan kalus, sehingga berat basah kalus mengalami penurunan. Sejalan dengan Julianti, dkk., (2021), bahwa penurunan berat basah kalus menandakan kandungan air pada kalus tersebut berkurang, namun di dalam sel kalus masih terdapat biomassa yang

mengandung metabolit sekunder.

Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) berupa auksin dan sitokinin apabila diberikan dengan perbandingan yang tepat dapat menginisiasi pembelahan sel dan dapat meningkatkan pertumbuhan pada sel. Pengaruh auksin terhadap pertumbuhan jaringan diduga dapat menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel. Pengasaman dinding sel menyebabkan ion K^+ masuk ke dalam sel sehingga dapat mengurangi potensial air di dalam sel. Hal ini mengakibatkan air mudah masuk ke dalam sel dan sel akan mengalami pembesaran. Penggunaan auksin 2,4-D dapat memacu terjadinya pertumbuhan kalus. Hal ini ditunjukkan dengan bertambahnya ukuran dan berat kalus yang tidak dapat balik. Pertumbuhan berkaitan dengan adanya pertambahan volume dan jumlah sel, pembentukan protoplasma baru dan pertambahan berat (Rahayu, dkk., 2003).

Berat basah kalus yang optimal dipengaruhi oleh pembelahan sel yang optimal. Hasil berat basah kalus yang berbeda menandakan sel pada tanaman memiliki respon absorpsi air yang berbeda. Pertambahan berat basah kalus erat kaitannya dengan kecepatan sel dalam melakukan pembelahan dan pembesaran sel yang bertambah sehingga mengalami peningkatan. Interaksi auksin dan sitokinin dalam kultur *in vitro* mampu membuat sel-sel pada jaringan tanaman mengalami proses pembelahan dan pembesaran sel (Ariani, dkk., 2016).

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

1. Kombinasi hormon 2,4-D dan Kinetin tidak berpengaruh nyata terhadap hari muncul kalus tetapi berpengaruh nyata terhadap berat basah kalus kopi robusta *Coffea canephora* L.asal Kurra, Polewali Mandar.
2. Konsentrasi yang paling cepat menumbuhkan kalus adalah konsentrasi dengan nilai rata-rata 15,3 HST. Adapun berat basah kalus. Sedangkan, nilai rata-rata berat basah kalus paling tinggi pada perlakuan A2B1 sebesar 0.49 gram, dan hasil terendah pada perlakuan A0B3 sebesar 0.05 gram.

V.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh diharapkan adanya penelitian lanjut untuk mengamati kalus dengan kadar hormon yang lebih bervariasi untuk mengetahui keefektifan dari hormon 2,4-D dan kinetin.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggara dan Marini. 2011. Respon Pembentukan Kalus Koro Benguk (*Mucuna Pruriens* L.) Pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D Dan Bap. Jurnal Mipa. Vol. 39 (1): 20-28.
- Ariani, R., Anggraito, Y, U., dan (*Mucuna Pruriens* L.) pada Berbagai Konsentrasi 2,4-D dan BAP. Jurnal MIPA. Vol. 39 (1) : 20-28.
- Bongase, Herianto, dan Arimarsetiowati, R. 2017. Pengaruh Auksin 2,4-D dan Sitokinin 2-ip Terhadap Pembentukan Embriogenesis Somatik Langsung Pada Eksplan Daun *Coffea arabica* L. Pelita Perkebunan. Vol. 27 (2): 68- 77.
- Ditjenbun, R., dan Ari H. 2015. Pengaruh Macam Zat Pengatur Tumbuh Alami terhadap Pertumbuhan Setek Beberapa Klon Kopi Robusta (*Coffea canephora*). Jurnal Ilmiah Pertanian. Vol. 14 (2): 71-81.
- De Melo dan De Sousa M, S, D. 2015. Faktor Penentu Keberhasilan Perbanyak Kopi (*Coffea* spp.) Melalui Embriogenesis Somatik. SIRINOV. Vol.3 (3): 127-136.
- Dinda, A., Lily, I., Muhammad, I, S., Hayatul, R., dan Nurcahyo, W, S. 2022. Inisiasi Kalus secara *In Vitro* dari Daun *Talinum paliculatum* (Jacq.) Wild pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D dan BAP. Jurnal Agrikultur. Vol. 33 (3) : 276-288.
- Dwi, K. dan Ixora, S, M. 2018. Peningkatan Pembentukan Kalus *Rhyncostilis retusa* Melalui Perendaman Eksplan Daun dalam Vitamin C dan Penambahan Arang Aktif pada Media Kultur *In Vitro*. Jurnal Prodi Biologi. Vol. 7 (4) : 255-261.
- Eko, R., Titin, S., dan Achmad, H. 2023. Induksi Kalus Eksplan Daun Lada (*Piper nigrum* L.) pada Modifikasi Media MS dengan Penambahan Hormon Sintetik dan Alami. Jurnal Agroforetech. Vol. 1 (2) : 998-1006.
- Exsyupransia, M., Aziz, P., Sukarti, M. dan Endang,, S. 2015. Induction of Somatic Embryogenesis through Overexpression of ATRKD4 Genes in *Phalaenopsis* “Sogo Vivien”. Jurnal Bioteknologi. Vol. 20 (1) : 42-53.
- Fetmi, S., Isnaini dan Widya, N. 2021. Induksi Daun Kalus Binahong Merah (*Basella rubra* L.) dengan Pemberian 2,4-D dan Kinetin. Jurnal Agroteknologi. Vol. 8 (2) : 274-285.

- Heni, D, S., Parawita, D. dan Firdha, N, A. 2022. Somatik Embriogenesis Anggerk *Dendrobium lasianthera* x *Dendrobium antennatum* dengan penambahan BA dan NAA. Jurnal Agron. Indonesia. Vol. 50 (2) : 202-208.
- Ibrahim, M, S, D., Rr S, H., Rubiyo., Agus, P., Sudarsono. 2013. Induksi Kalus Embriogenik dan Dayaregenerasi Kopi Arabika Menggunakan 2,4- Dichlorophenoxyacetic Acid Dan 6-Benzyladenine. Buletin RISTRI. Vol.4 (2) : 91-98.
- Indah, P, N. 2013 . Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn). Pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi 6-Benzylaminopurine (BAP) dan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). Surabaya. Jurnal sains dan seni pomits Vol.2(1): 2337-3520.
- Isda, M, N., dan Siti, F. 2014. Induksi Akar Pada Eksplan Tunas Anggrek *Grammatophyllum Scriptum* Var. *Citrinum* Secara In Vitro Pada Media Ms Dengan Penambahan Naa Dan Bap. Jurnal Biologi. Vol. 7 (2): 53-57.
- Imam, M., Wan, S. dan Yeni, S. 2016. Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode *In Vitro*. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia. Vol. 21 (2) : 84-89.
- Jumiani, S., Siti, Z., Miftah, A, W., Sherina, S., Zaky, N, R., Amin, N., dan Arif, Y. 2022. Pengaruh 2,4-D dan BAP terhadap Induksi Tunas dari Eksplan *Folium* dan *Petiolus communis* Tanaman Duku (*Lansium domesticum* Corr.). Jurnal Stigma. Vol. 15 (2) : 52-59.
- Kahpi, Ashabul. 2017. Budidaya dan Produksi Kopi Di Sulawesi Bagian Selatan pada Abad Ke-19. Journal of Cultural Sciences. Vol. 12 (1): 13-26.
- Kartikasari, P., M, Thamrin., Evie, R. 2013. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh 2,4- D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) dan Kinetin (6-Furfurylaminopurine) untuk Pertumbuhan Tunas Eksplan Pucuk Tanaman Jabon (*Anthocephalus cadamba* Miq. ex Roxb.) secara In Vitro. Lentera Bio. Vol. 2 (1): 75-80.
- Mahadi, I., Wan, Syafi'i., Yeni, S. 2016. Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus Microcarpa*) menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode In Vitro. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia. Vol. 21

(2): 84-8.

- Mariani, U., Yulita, N., Erma, P., dan Nintya, S. 2019. Pertumbuhan Kalus Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Varietas Permata F1 dari Jenis Eksplan dan Konsentrasi Sukrosa yang Berbeda secara *In Vitro*. Jurnal Life Science. Vol. 8 (2) : 160-169.
- Muhammad, I., Aulia, Rustikawati, dan Entang, I. 2020. Respon Temu Putih dan Temu Mangga dengan Pemberian BA dan 2,4-D secara *In Vitro*. Jurnal Gemo Agro. Vol. 25 (2) : 92-102.
- Muhammad, T, S., Neliyati, dan Jasminarni. 2019. Pengaruh ZPT 2,4-D dan Kinetin terhadap Induksi Kalus dari Eksplan Daun Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*). Jurnal J. Agriecotenia. Vol. 2 (1) : 39-51.
- Muhammad, R, M., Didik, P, R. dan Slameto. 2019. Pengaruh Konsentrasi 2,4-D terhadap Induksi Kalus Tanaman Sorgum (*Sorgum bicolor* (L.) Moench). Jurnal Bioindustri. Vol. 1 (2) : 138-148.
- Muhammad, N, K., Didik, P, R. dan Dwi, E, K. 2022. Somatik Embriogenesis Langsung dan Tidak Langsung pada Tanaman Porang (*Amarphopalles oncophilus*). Jurnal Agrotek Indonesia. Vol. 2 (7) : 42-45.
- Marlina, A, S., Mayta N, I. dan Siti, F. 2015. Induksi Kalus dari Eksplan Daun *In Vitro* Keladi Tikus (*Thyponium* sp.) dengan Perlakuan 2,4-D dan Kinetin. Jurnal Biologi. Vol. 8 (1) : 32-39.
- Nisrina, N, A., Muhammad, I, S., Lily, I., Ella, A., dan Nurcahyo, W, S. 2022. Inisiasi Kalus secara *In Vitro* dari Daun *Talinum paliculatum* (Jacq.) Geartn. Jurnal Buletin Kebun Raya. Vol. 25 (3) : 121-130.
- Nofrianinda, V., Farida, Y., Eva, Agustina. 2017. Pertumbuhan Planlet Stroberi (*Fragaria ananassa* D) Var. Dorit pada Beberapa Variasi Media Modifikasi *In Vitro* di Balai Penelitian Jeruk dan Buah Subtropika (BALITJESTRO). BIOTROPIC The Journal of Tropical Biology. Vol. 1 (1) : 32-41.
- Purwani. 2012. Pengaruh kombinasi konsentrasi ZPT NAA dan BAP pada kultur jaringan tembakau *nicotiana tabacum* var. prancak 95. Jurnal sains dan seni pomits. Vol 1(1) : 1-6.
- Pangestika, D., Samanhudi., Eddy T. 2015. Kajian Pemberian

Iaa dan Paclobutrazol terhadap Pertumbuhan Eksplan Bawang Putih. IKB. (16) : 34-47.

Purwanto, E, H., Rubiyo., dan Juniaty Towaha. 2015. Mutu dan Citarasa Kopi Robusta Klon Bp 42, Bp 358 Dan Bp 308 Asal Bali dan Lampung. Sirinov. Vol. 3 (2) : 67-74.

Putriana., Gusmiaty., Restu., M, Musriati., dan Aida, N. 2019. Respon Kinetik dan Tipe Eksplan Jabon Merah (*Antocephalus Macrophyllus* (Roxb.) Havil) Secara In Vitro. Bioma : Jurnal Biologi Makassar. Vol.4(1) : 48- 57.

Putri, N, I dan Dini, E., 2013. Induksi Kalus Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* Linn.) pada Beberapa Kombinasi Konsentrasi BAP dan 2,4-D. Jurnal Sains dan Seni Pomitas. Vol. 2 (1) : 3-6.

Rasud, Y dan Bustaman. 2020. Induksi Kalus secara In Vitro dari Daun Cengkeh (*Syzigium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPI). Vol. 25 (1) : 67-72.

Rahayu, B. 2003. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L. Biofarmasi. Vol 1 (1) : 1-6.

Rosmania, Zulfahmi, Probo, S., Ulfiatun dan Maisupratina. 2015. Induksi Kalus Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Melalui Eksplan Daun dan Petiol. Jurnal Agroteknologi. Vol. 6 (1) : 33-40.

Sri, R., Agus, P., Budi M., Ridho, K. dan Suryanah. 2009. Embriogenesis Somatik dari Eksplan Daun Anggrek *Phalaenopsis* sp L. Jurnal Agron. Indonesia. Vol. 37 (3) : 240-248.

Tirtha, J., Mayra, N, I. dan Dyah, I. 2019. Embriogenesis Somatik dari Kalus Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Asal Bengkalis dengan Pemberian BAP dan Madu secara *In Vitro*. Jurnal Biologi. Vol. 12 (1) : 8-17.

Lampiran 1. Komposisi Medium *Murashige and Skoog* (MS)

Tabel 6. Komposisi Media MS (Sabzevar, dkk., 2015)

Bahan Kimia	Formula	Konsentrasi dalam 1 Liter (Mg/L)
Makronutrien		
Amonium nitrate	NH_4NO_3	1650
Potassium nitrate	KNO_3	1900
Calcium chloride	$\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	440
Magnesium sulfate	$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	370
Potassium dihydrogen Orthophosphate	KH_2PO_4	170
Mikronutrien		
Manganese sulphate	$\text{MnSO}_4, 4\text{H}_2\text{O}$	22.30
Zinc sulphate	$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	8.60
Potassium iodide	KI	0.86
Cupric sulphate	$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0.026
Sodium molybdate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
Cobalt (ous) chloride	$\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$	0.026
Boric acid	H_3BO_3	6.20
Sumber Vitamin		
Nicotinic acid	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	0.50
Thiamine hydrochloride	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{OS}, \text{HCl}$	0.10
Pyridoxine hydrochloride	$\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2, 2\text{HCl}$	0.50
Glycine	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	2.00
Sumber Besi		
Sodium EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$	27.8
Ferrous sulphate	$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	37.2
Myo-inositol		0.1 g
Sucrose	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_3$	30 g
Phytigel		2 g

Lampiran 2. Hasil Uji ANOVA Untuk Hari Tumbuh Kalus

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Respon

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	33446.333 ^a	16	2090.396	16.031	.000
Hormon_2.4D	913.729	3	304.576	2.336	.092
Hormon_Kinetin	686.396	3	228.799	1.755	.176
Hormon_2.4D * Hormon_Kinetin	1896.187	9	210.687	1.616	.153
Error	4172.667	32	130.396		
Total	37619.000	48			

a. R Squared = .889 (Adjusted R Squared = .834)

Lampiran 3. Hasil Uji ANOVA Berat Basah Kalus

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Respon

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.844 ^a	15	.056	4.607	.000
Intercept	1.119	1	1.119	91.592	.000
Hormon_2.4D	.288	3	.096	7.851	.000
Hormon_Kinetin	.191	3	.064	5.214	.005
Hormon_2.4D * Hormon_Kinetin	.365	9	.041	3.324	.006
Error	.391	32	.012		
Total	2.353	48			
Corrected Total	1.235	47			

a. R Squared = .684 (Adjusted R Squared = .535)

Lampiran 4. Hasil Uji Lanjut Duncan Berat Basah Kalus

Respon

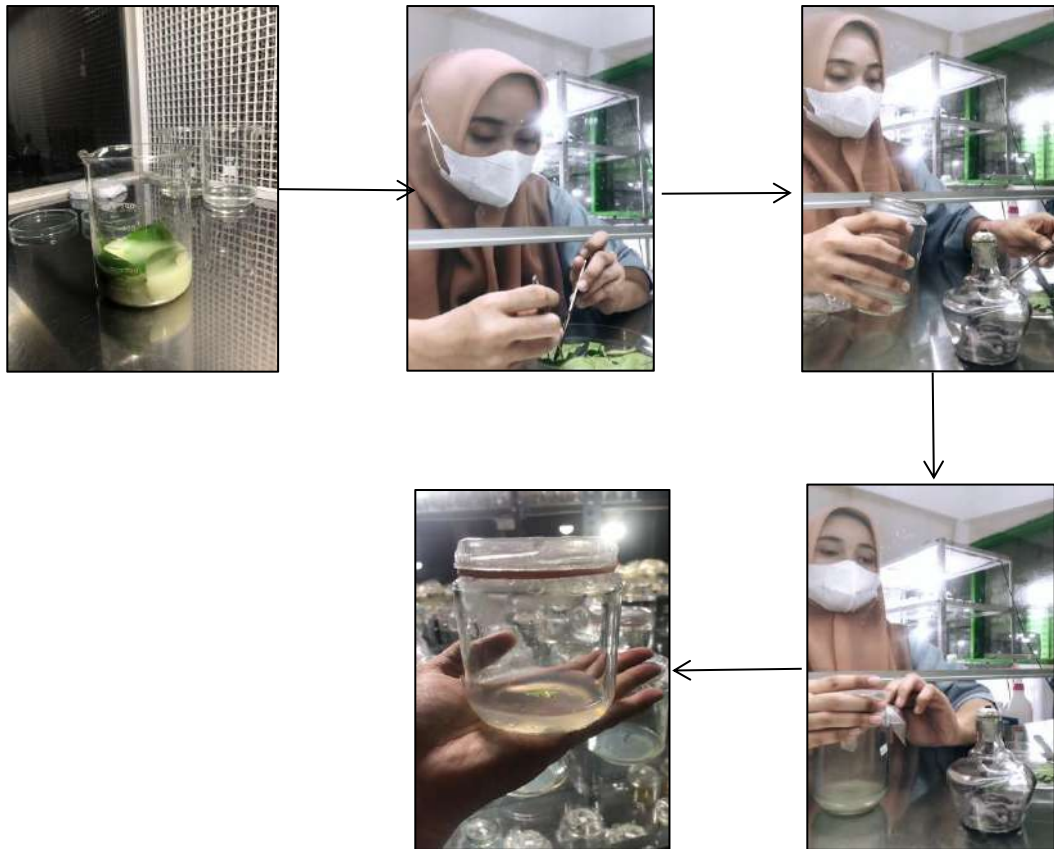
Duncan^a

Hormon2.4D Kinetin	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
A0B0	3	0.0000000			
A0B3	3	0.0584000	0.0584000		
A2B3	3	0.0649667	0.0649667		
A3B2	3	0.0718000	0.0718000		
A0B2	3	0.0737000	0.0737000		
A0B1	3	0.0765667	0.0765667		
A3B0	3	0.0791333	0.0791333		
A1B0	3	0.0806333	0.0806333		
A3B1	3	0.0859667	0.0859667		
A2B0	3	0.0965000	0.0965000		
A1B3	3	0.1240000	0.1240000		
A1B1	3		0.2376667	0.2376667	
A3B3	3		0.2463667	0.2463667	
A1B2	3		0.2518000	0.2518000	
A2B2	3			0.4018000	0.4018000
A2B1	3				0.4932000
Sig.		0.253	0.081	0.105	0.319

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

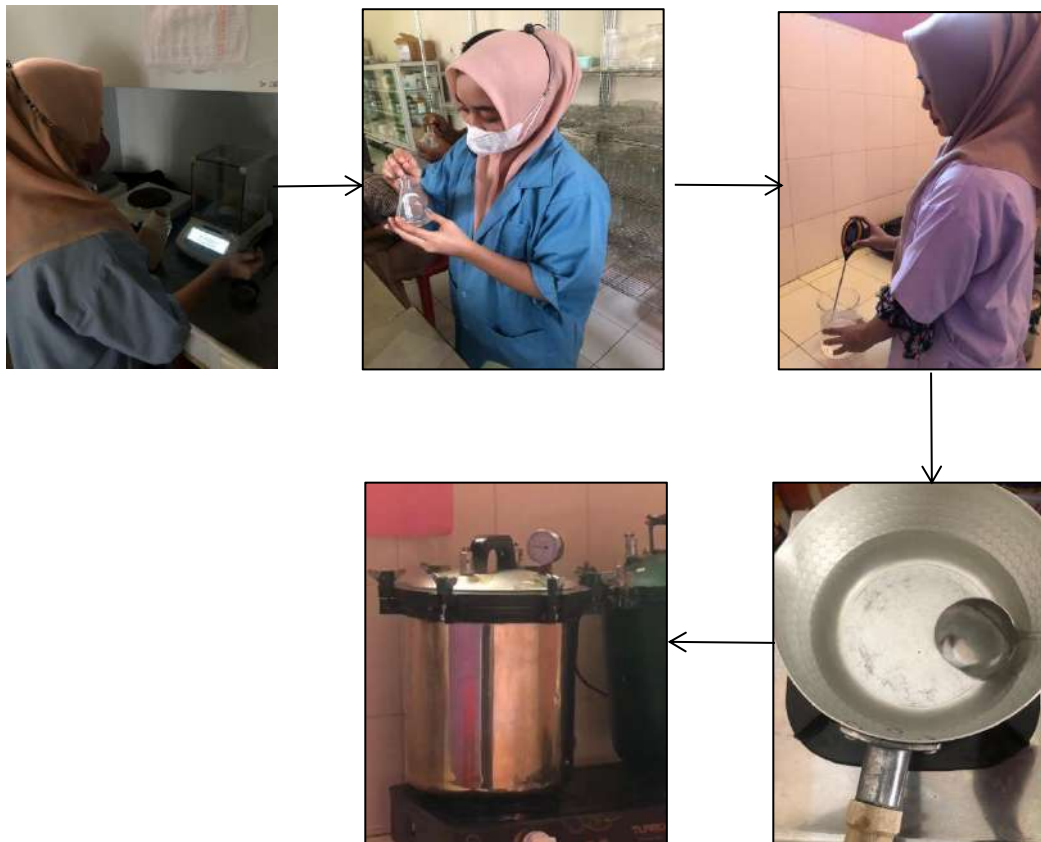
Lampiran 8. Penanaman



Keterangan:

1. Dilakukan steriliasi pada daun kopi robusta *Coffea canephora* L.
2. Diiris-iris daun kopi robusta *Coffea canephora* L. yang telah disterilkan.
3. Dimasukkan satu irisan daun kopi robusta *Coffea canephora* L. kedalam botol kultur.
4. Disimpan dirak kultur yang telah disediakan.

Lampiran 7. Pembuatan Media



Keterangan:

1. Ditimbang gula 30 gr/L, media MS 4,43 gr/L dan agar-agar 7 g/L.
Menggunakan timbangan analitik.
2. Dimasukkan kedalam gelas kimia dan ditambahkan hormon 2,4-D (*Dichlorophenoxy Acetic Acid*) dan Kinetin (*6-furfuryl amino purine*).
3. Diukur pH media, menggunakan termometer.
4. Dimasak menggunakan panci dalam kurung waktu yang tidak terlalu lama.
5. Dimasukkan kedalam botol kultur secukupnya yang telah disediakan.
6. Diautoklaf dengan suhu 121°C.

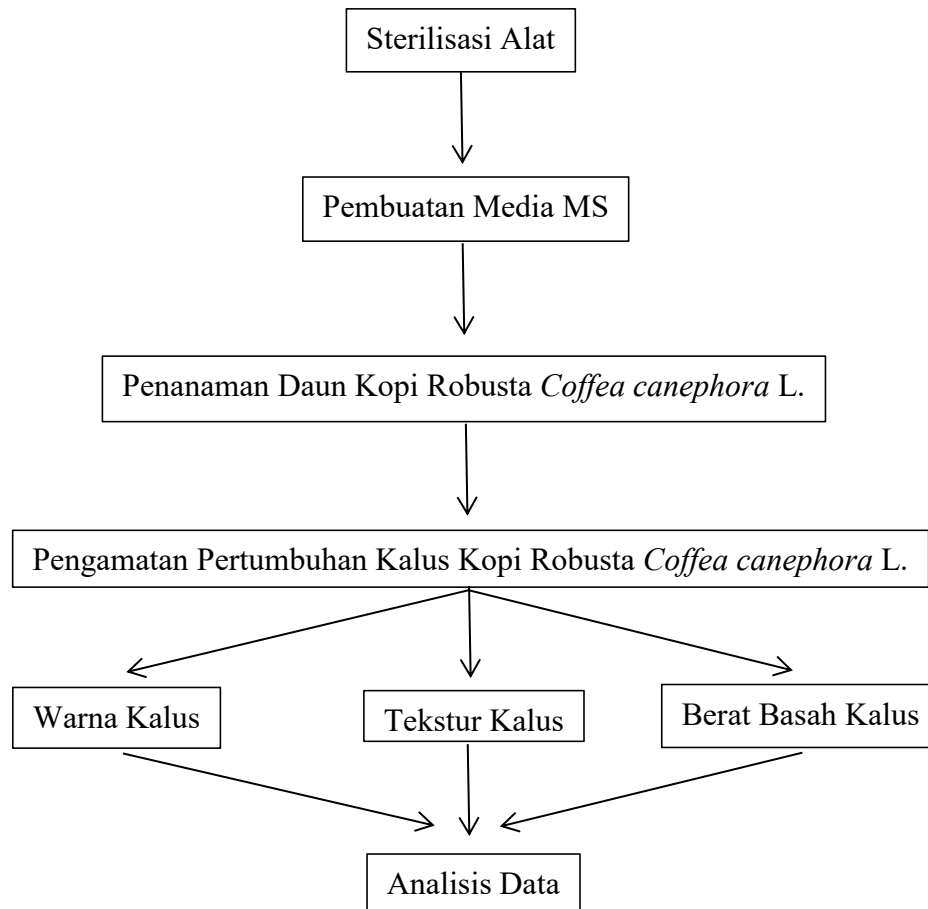
Lampiran 8. Pengamatan



Keterangan:

1. Dilakukan penyemprotan menggunakan Alkohol 70%.
2. Diamati ada tidaknya kalus yang muncul menggunakan kaca pembesar.
3. Ditimbang eksplan yang telah ditumbuhi oleh kalus menggunakan timbangan analitik.

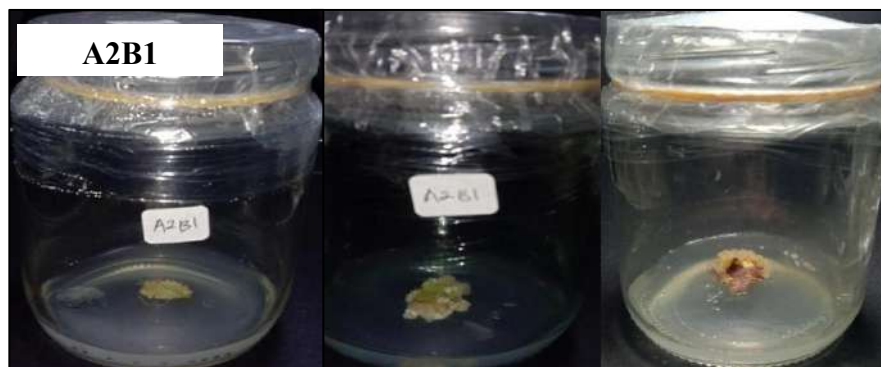
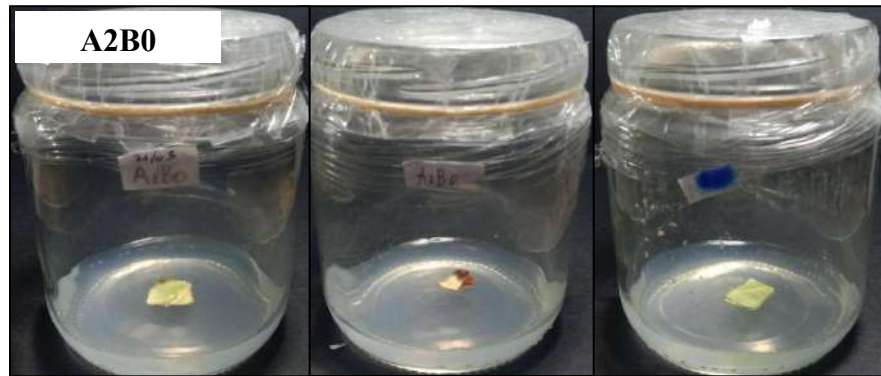
Lampiran 6. Skema Kerja



Lampiran 7. Hasil Pengamatan Kalus Tanaman Kopi Robusta *Coffea canephora* L. Asal Desa Kurrak, Kabupaten Polewali Mandar.









Lampiran 8. Perhitungan Pengambilan 2,4-D dalam Larutan Stok.

1. 2,4-D konsentrasi 1 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1 \text{ ppm} \times V1 = 1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$$

$$V1 = 0,25 \text{ mL}$$

2. 2,4-D Konsentrasi 2 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$2 \text{ ppm} \times V1 = 2 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{2 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$$

$$V1 = 0,50 \text{ mL}$$

3. 2,4-D Konsentrasi 3 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$3 \text{ ppm} \times V1 = 3 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{3 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$$

$$V1 = 0,75 \text{ mL}$$

Lampiran 9. Perhitungan Pengambilan Kinetin dalam Larutan Stok.

1. Kinetin Konsentrasi 0.5 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$0.5 \text{ ppm} \times V1 = 0.5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{0.5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$$

$$V1 = 0.125 \text{ mL}$$

2. Kinetin Konsentrasi 1 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1 \text{ ppm} \times V1 = 1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{1 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$$

$$V1 = 0,25 \text{ mL}$$

3. Kinetin Konsentrasi 1,5 ppm

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1.5 \text{ ppm} \times V1 = 1.5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}$$

$$V1 = \frac{1.5 \text{ ppm} \times 250 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}}$$

$$V1 = 0.375 \text{ mL}$$

Nilai rata-rata skor konsentrasi 2,4-D dan Kinetin terhadap hari muncul kalus

A\B	0 ppm Kinetin	0.5 ppm Kinetin	1 ppm Kinetin	1.5 ppm Kinetin
0 ppm 2,4-D	0.00	27.33	26.00	28.33
1 ppm 2,4-D	31.00	38.67	26.00	20.33
2 ppm 2,4-D	15.33	25.33	23.67	19.00
3 ppm 2,4-D	35.00	30.67	28.67	24.33

Nilai rata-rata skor konsentrasi 2,4-D terhadap hari muncul kalus

Perlakuan A	Nilai rata-rata peringkat
0 ppm 2,4-D	20.41
1 ppm 2,4-D	29.00
2 ppm 2,4-D	20.83
3 ppm 2,4-D	29.66

Nilai rata-rata skor konsentrasi Kinetin terhadap hari muncul kalus

Perlakuan B	Nilai rata-rata peringkat
0 ppm Kinetin	20.33
0.5 ppm Kinetin	30.50
1 ppm Kinetin	26.08
1.5 ppm Kinetin	22.99

Nilai rata-rata skor konsentrasi 2,4-D dan Kinetin terhadap berat basah kalus

A\B	0 ppm Kinetin	0.5 ppm Kinetin	1 ppm Kinetin	1.5 ppm Kinetin
0 ppm 2,4-D	0.000	0.077	0.074	0.058
1 ppm 2,4-D	0.081	0.238	0.252	0.124
2 ppm 2,4-D	0.097	0.493	0.402	0.065
3 ppm 2,4-D	0.079	0.086	0.072	0.246

Nilai rata-rata skor konsentrasi 2,4-D terhadap berat basah kalus

Perlakuan A	Nilai rata-rata peringkat
0 ppm 2,4-D	0.052
1 ppm 2,4-D	0.174
2 ppm 2,4-D	0.264
3 ppm 2,4-D	0.121

Nilai rata-rata skor konsentrasi Kinetin terhadap berat basah kalus

Perlakuan B	Nilai rata-rata peringkat
0 ppm Kinetin	0.064
0.5 ppm Kinetin	0.223
1 ppm Kinetin	0.200
1,5 ppm Kinetin	0.123