

**EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* KOPI ROBUSTA (*Coffea  
canephora* Pierre ex Froehner) KLON UNGGUL  
LOKAL LAMPUNG**

**(Tesis)**

**Oleh**

**RAHMADYAH HAMIRANTI**

**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER AGRONOMI  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**

## ABSTRAK

### EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) KLON UNGGUL LOKAL LAMPUNG

Oleh

**Rahmadyah Hamiranti**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan prosedur embriogenesis somatik *in vitro* pada kopi robusta unggul lokal lampung dari eksplan daun. Penelitian ini terdiri dari 3 percobaan yaitu pengaruh jenis eksplan daun dan formulasi media terhadap induksi kalus primer, respons induksi kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) terhadap dua formulasi media dan pengaruh klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan formulasi media induksi kalus primer terhadap pembentukan kalus embriogenik pada media embrogenesis. Ketiga percobaan tersebut dilakukan di Laboratorium Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Percobaan I dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan 3 jenis potongan daun dan 6 jenis formulasi media. Percobaan II dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan 4 klon kopi robusta dan 2 jenis formulasi media terbaik yang didapatkan dari Percobaan I. Percobaan III dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Bahan tanaman yang digunakan adalah kalus primer umur 4 MST yang terbentuk pada dua media terbaik pada Percobaan II. Data dari ketiga percobaan dianalisis menggunakan *standar error* (SE) menurut Walpole (1997).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan daun dengan tulang daun di bagian tengah dan bagian samping yang dikulturkan pada media  $\frac{1}{2}$  MS + 1mg/L BA dan pada media NPCM + 1mg/L 2,4 D + 2mg/L TDZ menunjukkan persentase pembentukan kalus primer yang paling tinggi yaitu masing-masing sebesar 100%. Media NPCM + 1mg/L 2,4 D + 2mg/L TDZ menginduksi ukuran kalus yang

paling tinggi yang ditunjukkan dengan nilai skor sebesar  $3,87 \pm 0,07$ . Eksplan dari klon Komari dan Wanto yang dikulturkan pada media NPCM + 1mg/L 2,4 D + 2mg/L TDZ menghasilkan ukuran kalus primer yang paling tinggi yang ditunjukkan dengan nilai skor sebesar  $4,00 \pm 0,00$ . Kalus primer dari klon Komari yang diinduksi pada media NPCM + 1mg/L 2,4 D + 2mg/L TDZ menghasilkan kalus embriogenik (12 MST) dan embrio somatik (16 MST) dengan persentase tertinggi masing-masing sebesar 82,86% dan 44,83%.

**Kata kunci :** embriogenesis somatik kopi, induksi kalus primer, kultur jaringan kopi, klon kopi lokal, 2,4 D, TDZ.

## **ABSTRACT**

### **SOMATIC EMBRYOGENESIS *IN VITRO* OF LOCAL SUPERIOR CLONES OF LAMPUNG ROBUSTA COFFEE (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner)**

**By**

**Rahmadyah Hamiranti**

This study aims to obtain procedure of *in vitro* somatic embryogenesis in local superior robusta coffee from leaf explants. This study consisted of three experiments, i.e. (1) the effect of leaf explants and media formulations on primary callus induction, (2) the response of primary callus induction from robusta coffee clones (Komari, Tugino, Siswanto and Tugu Sari) to two media formulations and (3) the effect of robusta coffee clones (Komari, Tugino, Siswanto and Tugu Sari) and media formulation on primary callus induction for embryogenic callus formation in embrogenesis media. The three experiments were conducted at the Plant Sciences Laboratory and a Greenhouse of the Faculty of Agriculture, University of Lampung. The first experiment was conducted using a completely randomized design with 3 types of dissected leaf and 6 types of media formulations. The second experiment was conducted using a completely randomized design with 4 robusta coffee clones and 2 types of the best media formulations which obtained from first experiment. The third experiment was conducted using a completely randomized design with 3 replications. The explant was primary callus which was formed on the two best media in second experiment. The data from all three experiments were analyzed using standard error (SE) according to Walpole (1997).

The results showed that the highest percentage (100%) of primary callus formation was found in leaf explants with main vein and second vein parts which cultured on  $\frac{1}{2}$  MS + 1mg / L BA and in NPCM + 1mg / L 2.4 D + 2mg / L TDZ.

The highest callus size was found in NPCM + 1mg / L 2.4 D + 2mg / L TDZ, as indicated by a score of  $3.87 \pm 0.07$ . The explants from Komari and Wanto clones which cultured on NPCM + 1mg / L 2.4 D + 2mg / L TDZ had the highest primary callus size, as indicated by a score of  $4.00 \pm 0.00$ . The primary callus of Komari clone which cultured on NPCM + 1mg / L 2.4 D + 2mg / L TDZ, had the highest percentage of embryogenic callus (82.86%) and somatic embryos (44, 83%).

**Keywords:** somatic embryogenesis of coffee, primary callus induction, tissue culture of coffee, local coffee clones, 2.4 D, TDZ.

**EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* KOPI ROBUSTA (*Coffea  
canephora* Pierre ex Froehner) KLON UNGGUL  
LOKAL LAMPUNG**

**Oleh**

**RAHMADYAH HAMIRANTI**

**Tesis**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
MAGISTER SAINS**

**Pada**

**Program Studi Pascasarjana Magister Agronomi  
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**PROGRAM PASCASARJANA MAGISTER AGRONOMI  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2019**

Judul Tesis : **EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO***  
**KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora***  
**Pierre ex Froehner) KLON UNGGUL**  
**LOKAL LAMPUNG**

Nama Mahasiswa : **Rahmadyah Hamiranti**

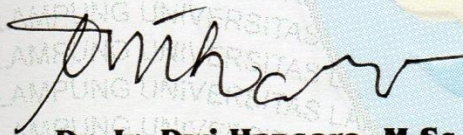
Nomor Pokok Mahasiswa : 1624011018

Program Studi : Magister Agronomi


Fakultas : Pertanian

**MENYETUJUI**

1. Komisi Pembimbing

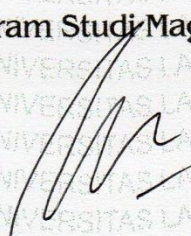


**Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.**  
NIP 196104021986031003



**Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.**  
NIP 196108031986032002

2. Ketua Program Studi Magister Agronomi



**Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.**  
NIP 196108031986032002

## MENGESAHKAN

### 1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc.**

Sekretaris : **Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc.**

Penguji I  
Bukan Pembimbing : **Dr. Ir. Agus Karyanto, M.Sc.**

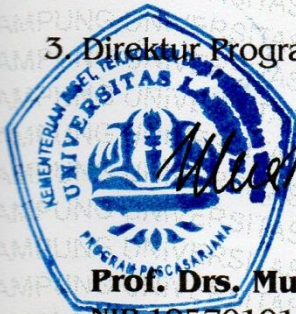
Penguji II  
Bukan Pembimbing : **Prof. Dr. Ir. Kukuh Setiawan, M.Sc.**

### 2. Dekan Fakultas Pertanian



**Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.**  
NIP 196110201986031002

### 3. Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung



**Prof. Drs. Mustofa, MA., Ph.D.**  
NIP 195701011984031020

Tanggal Lulus Ujian Tesis : **2 Juli 2019**



## LEMBAR PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan sebenarnya bahwa:

1. Tesis dengan judul **“EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) KLON UNGGUL LOKAL LAMPUNG”** adalah karya saya sendiri dan saya tidak melakukan penjiplakan atas karya penulis lain dengan cara tidak sesuai dengan norma etika ilmiah yang berlaku dalam masyarakat akademik atau yang disebut plagiarisme.
2. Pembimbing penulisan tesis ini berhak mempublikasikan sebagian atau seluruh tesis ini pada jurnal ilmiah dengan mencantumkan nama saya sebagai salah satu penulisnya.
3. Hak intelektual atas karya ilmiah ini diserahkan sepenuhnya kepada Universitas Lampung.

Apabila dikemudian hari ternyata ditemukan adanya ketidakbenaran, saya bersedia menanggung akibat dan sanksi yang diberikan kepada saya dan saya bersedia dan sanggup dituntut sesuai hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 2 Juli 2019  
Pembuat pernyataan,



Rahmadyah Hamiranti  
NPM 1624011018

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Jakarta pada tanggal 22 Maret 1995 sebagai anak kedua dari dua bersaudara dari pasangan Ibu Purwantini dan Bapak Abdul Hamid.

Penulis menyelesaikan pendidikan di Sekolah Dasar Negeri 1 Poncowati Kabupaten Lampung Tengah pada tahun 2006; Sekolah Menengah Pertama Negeri 1 Terbanggi Besar pada tahun 2009; Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Terbanggi Besar pada tahun 2012. Pada tahun 2016 penulis menyelesaikan pendidikan Sarjana Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Penulis melanjutkan studi di Pascasarjana Program Studi Magister Agronomi Universitas Lampung pada tahun 2017.

## *PERSEMBAHAN*

*Kupersembahkan karya sederhana ini sebagai rasa bakti,  
hormat, tanggung jawab, dan terima kasih Kepada:*

*Keluarga yang kucintai dan kusayangi  
Bapak Kamidi, Ibu Sukitri, Mama Purwantini, Bule Tantri,  
Mas Adi dan Okta yang telah memberikan dukungan dan  
semangat hingga terselesaikannya tesis ini*

*Almamaterku tercinta*

*Universitas Lampung*

*“Allah SWT will raise those who have believed among you  
and those who were given knowledge, by degrees”  
(QS. Al-Mujadilah: 11)*

*“The most important thing to enjoy your life is to be happy -  
it’s all that matters” (Audrey Hepburn)*

*Everything happens for some reasons, so keep being hopeful  
and grateful every day.*

## SANWACANA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis yang berjudul “**EMBRIOGENESIS SOMATIK *IN VITRO* KOPI ROBUSTA (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) KLON UNGGUL LOKAL LAMPUNG**”. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan dukungan dari beberapa pihak, penulisan tesis ini tidak akan terselesaikan dengan baik, karena itu pada kesempatan ini, penulis menyampaikan terimakasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Ir. Dwi Hapsoro, M.Sc., selaku dosen Pembimbing Utama dan Kepala Laboratorium Ilmu Tanaman atas waktu, kesabaran, bimbingan, nasihat dan pengarahan yang telah diberikan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan tesis.
3. Ibu Prof. Dr. Ir. Yusnita, M.Sc., selaku dosen Pembimbing Kedua dan Ketua Program Studi Pascasarjana Magister Agronomi atas waktu, kesabaran, bimbingan, nasihat dan pengarahan yang telah diberikan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan tesis

4. Bapak Dr. Ir. Agus Karyanto, M.Sc., selaku Penguji I bukan Pembimbing atas kritikan, masukan, saran dan nasihat yang telah diberikan selama penulisan tesis ini.
5. Bapak Prof. Dr. Ir. Kukuh Setiawan, M.Sc., selaku Penguji II bukan Pembimbing atas kritikan, masukan, saran dan nasihat yang telah diberikan selama penulisan tesis ini.
6. Ibu Sri Ramadiana, S.P., M.Si., yang telah memberikan bantuan, saran, masukan, nasihat dan semangat selama penulis melaksanakan penelitian.
7. Bapak, Ibu, Mama, Bule, Mas Adi dan Okta atas doa, kasih sayang, nasihat, dan dukungan yang selalu diberikan kepada penulis.
8. Sahabat-sahabat penulis: Cahyaning Windarni, S.Hut., Dwi Nur Kinasih, S.Si., Mentari Pertiwi, S.P., Mesva Riza Lista, S.P., Misluna, S.P., dan Resti Astria, S.P., atas semangat, dukungan, doa, dan nasihat yang diberikan kepada penulis
9. Teman-teman di Laboratorium Ilmu Tanaman: Adi Noor Prayogi, S.P., Bimo Nur Prabowo, S.P., Deta Iktaria, S.P., Dwi Setiawan, Emi Yunida dan Hayane Adeline Warganegara, S.P., M.Si., yang telah memberikan bantuan dan kerjasama yang baik selama penulis melaksanakan penelitian.
10. Teman-teman kuliah Magister: Abdi Rachmansyah, S.P., Adawiah, S.P., M.Si., Husna, S.P., Hafiz Luthfi, S.P., Ika Rachma Pangesti, S.P., Resti Puspa Kartika Sari, S.P., Yeyen Ilmiasari, S.P., atas bantuan, semangat, dan doa selama perkuliahan dan penyusunan tesis.

11. Semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu baik secara langsung maupun tidak langsung dalam melaksanakan dan menyelesaikan tesis ini.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmat atas bantuan yang telah mereka berikan kepada penulis. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam tesis ini, akan tetapi penulis berharap semoga tesis ini dapat berguna dan bermanfaat bagi pembaca. Amin.

Bandar Lampung, Juli 2019

Rahmadyah Hamiranti

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	viii
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	6
1.3 Kerangka Pemikiran.....	7
1.4 Hipotesis .....	9
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	10
2.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Kopi Robusta .....	10
2.2 Teknik Perbanyakan Kopi.....	12
2.3 Kultur Jaringan Kopi.....	13
2.4 Media Kultur .....	16
2.5 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT).....	16
2.6 Benzyladenin.....	17
2.7 Thidiazuron .....	18
2.8 <i>2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)</i> .....	19



<b>III. BAHAN DAN METODE</b> .....	21
3.1 Percobaan I : Pengaruh jenis eksplan daun dan formulasi media terhadap induksi kalus primer .....	21
3.1.1 Bahan Tanaman .....	21
3.1.2 Sterilisasi Eksplan .....	23
3.1.3 Media Kultur .....	23
3.1.4 Penanaman Eksplan dan Ruang Kultur .....	24
3.1.5 Rancangan Percobaan .....	25
3.1.6. Pengamatan .....	25
3.2 Percobaan II : Respons induksi kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) terhadap dua formulasi media induksi kalus primer .....	26
3.2.1 Bahan Tanaman .....	26
3.2.2 Sterilisasi Eksplan .....	27
3.2.3 Media Kultur .....	27
3.2.4 Penanaman Eksplan dan Ruang Kultur .....	28
3.2.5 Rancangan Percobaan .....	28
3.2.6. Pengamatan .....	28
3.3 Percobaan III : Pengaruh klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan formulasi media induksi kalus primer terhadap induksi kalus embriogenik pada media embriogenesis. ....	28
3.3.1 Bahan Tanaman .....	28
3.3.2 Media Kultur .....	28
3.3.3 Penanaman Eksplan dan Ruang Kultur .....	29
3.3.4 Rancangan Percobaan .....	29
3.3.5. Pengamatan .....	29

<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>30</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	30
4.1.1 Percobaan I : Pengaruh jenis eksplan daun dan formulasi media terhadap induksi kalus primer .....	30
4.1.2 Percobaan II : Respons induksi kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) terhadap dua formulasi media .....	34
4.1.3 Percobaan III : Pengaruh klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan formulasi media induksi kalus primer terhadap induksi kalus embriogenik pada media embriogenesis .....	36
4.2 Pembahasan .....	41
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>46</b>
4.1. Kesimpulan .....	46
4.2. Saran .....	47
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>53</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Media induksi kalus primer .....	24
2. Rata-rata persentase eksplan berkalus dan skoring dari tiga potongan daun dan dua formulasi media induksi kalus primer .....	32
3. Rata-rata persentase eksplan berkalus dan skoring dari klon kopi robusta dan dua formulasi media induksi kalus primer .....	34
4. Rata-rata persentase kalus primer yang mampu membentuk kalus embriogenik dan embrio somatik.....	39
5. Formulasi Media Murashige & Skoog (Murashige, 1962) .....	54
6. Formulasi Media NPCM (Samson <i>et al.</i> , 2006) .....	55
7. Formulasi Media E (Samson <i>et al.</i> , 2006) .....	56
8. Formulasi Media R (Samson <i>et al.</i> , 2006) .....	57
9. Persentase jumlah kalus primer dan skoring dari 3 jenis potongan daun dan 6 jenis formulasi media.....	58
10. Persentase eksplan berkalus dan skoring dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan dua formulasi media induksi kalus primer .....	60
11. Persentase kalus primer yang mampu membentuk kalus embriogenik dan embrio somatik.....	61

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Rumus bangun Benzyladenin.....	17
2. Rumus bangun Thidiazuron .....	18
3. Rumus bangun 2,4-D .....	19
4. Daun muda kopi yang digunakan sebagai eksplan (a) TDT, (b) TDS, (c) TTD .....	22
5. Kalus yang terbentuk pada eksplan daun kopi robusta (a) Skor 0, (b) Skor 1, (c) Skor 2, (d) Skor 3, (e) Skor 4 .....	26
6. Keragaan tanaman kopi robusta klon unggul lokal Lampung (a) Tugino, (b) Siswanto, (c) Komari.....	27
7. Kalus primer yang muncul pada umur 2 MST (a) Eksplan TDT, (b) Eksplan TDS, (c) Eksplan TTD .....	30
8. Kalus primer yang muncul pada eksplan TDT (a) Pada 3 MST, (b) Pada 4 MST .....	31
9. Kalus primer 4 MST (a) Eksplan TDT, (b) Eksplan TDS, (c) Eksplan TTD .....	31
10. Kalus pada umur 4 MST (a) Kalus pada media M1B1, (b) Kalus pada media M2B1, (c) Kalus pada media M1D1T2, (d) Kalus pada media M1D2T2, (e) Kalus pada media N1D1T2, (f) Kalus pada media N1D2T2 .....	33
11. Kalus primer 4 MST (a) Klon Tugusari pada media M2B1 (kiri) dan N1D1T2 (kanan), (b) Klon Komari pada media M2B1 (kiri) dan media N1D1T2 (kanan), (c) Klon Tugino pada media M2B1 (kiri) dan media N1D1T2 (kanan), (d) Klon Wanto pada media M2B1 (kiri) dan media N1D1T2 (kanan) .....	35

12. Hasil <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM) (a) Kalus embriogenik 8 MST, (b) Kalus embriogenik 12 MST, (c) Embrio somatik fase globular 16 MST .....	37
13. Penampakan visual perkembangan kalus primer menjadi embrio somatik (a) Kalus primer dari media M2B1, (b) Kalus embriogenik 8 MST dari media M2B1, (c) Kalus embriogenik 12 MST dari media M2B1, (d) Embrio somatik dari media M2B1 (16 MST), (e) Kalus primer dari media N1D1T2, (f) Kalus embriogenik 8 MST dari media N1D1T2, (g) Kalus embriogenik 12 MST dari media N1D1T2, (h) Embrio somatik dari media N1D1T2 (16 MST).....	38
14. Perkembangan embrio somatik dari kopi robusta klon Wanto (a) Fase globular, (b) Fase hati, (c) Fase torpedo, (d) Embrio memanjang ( <i>elongated embryo</i> ), (e) Kecambah, (f) Tunas kopi .....	40

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu hasil komoditi perkebunan yang memiliki nilai ekonomis yang tinggi diantara tanaman perkebunan lainnya dan berperan penting sebagai sumber devisa negara. Kopi juga merupakan sumber penghasilan bagi tidak kurang dari satu setengah juta jiwa petani kopi di Indonesia (Rahardjo, 2012). Total nilai ekspor kopi pada tahun 2017 tercatat sebesar 1,2 miliar dollar AS, nilai ini meningkat 17,48% dari tahun sebelumnya (BPS, 2017).

Kopi Indonesia memiliki nilai yang tinggi di pasar dunia. Hal ini merupakan indikasi bahwa klon yang ada di Indonesia adalah klon yang disukai karena cita rasanya, oleh karena itu perlu diproduksi dalam jumlah yang besar. Jenis kopi yang terkenal di Indonesia adalah robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner) dan arabika (*C. arabica* L.). Proporsi total keseluruhan produksi kopi di Indonesia didominasi oleh kopi robusta yaitu sebesar 85% dan sisanya adalah kopi arabika (Direktorat jenderal perkebunan, 2017).

Saat ini Indonesia memiliki luasan total untuk perkebunan kopi yang meningkat dari tahun 2014 sampai 2016. Luasan total dari perkebunan rakyat, perkebunan negara, perkebunan swasta pada tahun 2014, 2015 dan 2016 adalah masing-masing sebesar 1.230.495 ha, 1.233.227 ha, dan 1.233.294 ha. Dari luasan

tersebut diperoleh produksi (dalam ton) sebesar 643.857, 664.460 dan 667.655 (Direktorat jenderal perkebunan, 2017). Total produksi tersebut masih tergolong sangat rendah jika dibandingkan dengan produktivitas kopi di berbagai negara produsen kopi. Nilai rata-rata produktivitas kopi di perkebunan Indonesia pada tahun 2018 sebesar 722 kg/ha sedangkan di Brazil mencapai 1.800 kg/ha (USDA, 2018).

Perkebunan kopi yang ada di Indonesia umumnya merupakan perkebunan rakyat yang belum menggunakan teknik budidaya yang intensif. Hal ini menyebabkan pemeliharaan tanaman yang kurang optimal, sehingga produktivitasnya lebih rendah jika dibandingkan dengan Brazil sebagai negara penghasil kopi nomor 1 di dunia. Pada perkebunan rakyat umumnya bibit yang digunakan merupakan bibit yang diperbanyak secara generatif (melalui biji). Kopi robusta merupakan tanaman yang menyerbuk silang (*allogamous*) sehingga biji yang dihasilkan memiliki sifat yang tidak sama dengan induknya. Selain itu kopi robusta juga bersifat *self incompatible* (Anim-Kwapong, *et al.*, 2010), sehingga untuk menghasilkan buah kopi yang maksimal diperlukan penataan pertanaman di lapangan yang dilakukan secara poliklonal yaitu klon yang berbeda-beda ditanam secara berselang-seling dan berdekatan. Sehingga klon yang saling bersebelahan dapat saling mendukung untuk terjadinya penyerbukan silang secara maksimal (Erdiansyah, *et al.*, 2016).

Oleh karena itu untuk penanaman kopi robusta yang baik dan benar diperlukan klon-klon unggul yang diperbanyak secara vegetatif (klonal) sehingga mampu mendapatkan bibit kopi yang seragam dan sesuai dengan induknya. Di Indonesia

perbanyak secara vegetatif yang pernah dan sering dilakukan adalah dengan cara menyambung dan menyetek. Namun kedua cara ini belum mampu menghasilkan bibit kopi yang seragam dalam jumlah besar. Hal ini karena kegiatan menyambung dan menyetek tidak efisien dalam pertanaman kopi dalam skala besar dan kemungkinan hidup dari bahan stek dan sambungan relatif kecil. Disamping itu jumlah bibit yang dihasilkan bergantung pada jumlah stek yang ditanam dan *seedling* yang disambung dengan entress.

Dalam rangka meningkatkan ketersediaan bibit berkualitas dari klon-klon kopi unggul yang memiliki sifat genetik yang seragam dan dapat tersedia dalam jumlah besar salah satu teknik yang dapat digunakan adalah kultur jaringan (Deo *et al.*, 2010). Teknik kultur jaringan akhir-akhir ini telah banyak dilakukan termasuk untuk beberapa jenis tanaman kopi (*Coffea* sp). Teknik ini didasarkan atas sifat totipotensi sel tumbuhan yang berarti kemampuan setiap sel tumbuhan untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh bila diberikan lingkungan yang sesuai. Dengan cara ini dapat dihasilkan bibit tanaman kopi yang seragam dalam jumlah besar. Ducos *et al.* (2003) menyatakan bahwa tanaman kopi yang diperbanyak melalui embriogenesis memiliki karakter dan kemampuan produksi yang sama dengan induknya dan tidak berbeda nyata dengan tanaman kopi yang dihasilkan melalui stek.

Penelitian mengenai perbanyak tanaman kopi secara *in vitro* sudah banyak dilakukan. Namun kemampuan regenerasi tanaman seringkali bersifat *species-specific*, artinya seringkali tanaman dari genotipe yang berbeda akan memberikan respon regenerasi tunas atau embrio yang juga berbeda (Yusnita, 2015). Oleh



karena itu perlu didapatkan prosedur regenerasi *in vitro* tanaman kopi robusta yang sesuai dengan genotipe tanaman yang sudah beradaptasi di Lampung, sehingga ketersediaan bibit dalam jumlah banyak dapat diwujudkan.

Embriogenesis somatik dapat terbentuk secara langsung dari eksplan (tanpa melalui tahap pembentukan kalus) atau secara tidak langsung (melalui tahap pembentukan kalus). Embriogenesis secara tidak langsung lebih sering dilakukan karena dapat menghasilkan embrio yang lebih banyak dibandingkan secara langsung (Yuwono, 2008). Pembentukan embrio somatik secara langsung sering ditemukan terhambat karena terjadi browning pada eksplan akibat adanya oksidasi senyawa fenol dari jaringan eksplan (Santos-Briones and Hernandez-Sotomayor, 2006).

Embriogenesis somatik tidak langsung dilakukan melalui 4 tahapan yaitu induksi kalus primer, induksi kalus embriogenik dari kalus primer dan inisiasi embrio somatik, pematangan embrio somatik (*ES maturation*) dan regenerasi tanaman dari embrio somatik (Handayani, 2008). Hasil penelitian Samson *et al.* (2006) menunjukkan bahwa penggunaan media dasar pada tahap induksi kalus primer dan induksi kalus embriogenik memberikan hasil yang berbeda pada tiap jenis medianya. Selain media dasar, jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh juga mempengaruhi pembentukan kalus primer dan kalus embriogenik. Ibrahim *et al.* (2013) menyatakan bahwa penggunaan 1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l thidiazuron dan 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l thidiazuron dalam media dasar NPCM (*New Primary Culture Medium*) menghasilkan lebih banyak embrio dengan fase globular dan torpedo pada embriogenesis kopi arabika. Ducos *et al.* (2007) menggunakan media dasar

¼ MS dengan penambahan 5 µM BA untuk menginduksi kalus sampai dengan regenerasi embrio somatik menjadi planlet utuh.

Bagian organ yang sering digunakan sebagai eksplan dalam kultur jaringan kopi adalah daun muda. Daun yang sering digunakan dalam pembentukan kalus embriogenik pada tanaman kopi adalah bagian daun tanpa tulang daun (Ducos *et al.* 2003, Samson *et al.* 2006, Ducos *et al.* 2007, Santana *et al.*, 2007, Ahmed *et al.*, 2013, Etienne *et al.*, 2013 dan Ibrahim *et al.* 2013).

Klon kopi robusta unggul lokal didapatkan dari dua kabupaten di Lampung yaitu Tanggamus dan Lampung Barat. Di kabupaten Tanggamus telah didapatkan lima klon kopi robusta unggul yang oleh para petani diberi nama klon Tugino, klon Biyadi, klon Siswanto, klon Wardi dan klon Komari. Klon Tugino dan klon Siswanto telah mendapat penghargaan sebagai pemenang I dan II (Siswanto) oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao dalam Lomba Kopi Unggul Nasional Tahun 2015. Keunggulan klon-klon kopi robusta pemenang lomba adalah berdasarkan produktivitas per pohon dan cita rasanya. Klon Komari adalah klon unggul pilihan petani yang produksinya stabil tinggi dengan cita rasa tinggi namun belum diikuti lomba (Buniman, komunikasi personal, 2018). Di Lampung Barat terdapat beberapa klon unggul dari segi produktivitas pilihan petani salah satunya adalah klon Tugu Sari. Dalam penelitian ini digunakan 4 klon unggul lokal yang terpilih yaitu klon Tugino, klon Siswanto, klon Komari dan klon Tugu Sari.

Penelitian ini dilakukan untuk menjawab masalah yang dirumuskan dalam pertanyaan berikut:

1. Bagaimanakah pengaruh jenis eksplan daun dan formulasi media terhadap induksi kalus primer.
2. Bagaimanakah respons induksi kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto, Tugu Sari) terhadap dua formulasi media.
3. Bagaimanakah pengaruh klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan dua formulasi media induksi kalus primer terhadap induksi kalus embriogenik pada media embrogenesis.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan prosedur embriogenesis somatik *in vitro* pada kopi robusta unggul lokal Lampung dari eksplan daun. Penelitian ini terdiri dari 3 percobaan :

1. Pengaruh jenis eksplan daun dan formulasi media terhadap induksi kalus primer.
2. Respons induksi kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) terhadap dua formulasi media.
3. Pengaruh klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan dua formulasi media induksi kalus primer terhadap induksi kalus embriogenik pada media embriogenesis.

### 1.3 Kerangka Pemikiran

Perbanyakan tanaman kopi robusta secara generatif tidak bisa menghasilkan bibit kopi yang seragam dan sesuai dengan induknya. Hal ini karena kopi robusta termasuk salah satu tanaman yang menyerbuk silang. Sehingga sulit didapatkan tanaman yang mempunyai sifat yang sama dengan induk yang diinginkan. Upaya pembiakan secara kultur jaringan merupakan alternatif untuk mengatasi masalah tersebut.

Teknik kultur jaringan telah banyak dilakukan termasuk untuk beberapa jenis tanaman kopi (*Coffea* sp). Teknik ini didasarkan atas sifat totipotensi sel tumbuhan yang berarti setiap sel tumbuhan mampu menurunkan sifat dan mempunyai potensi yang sama dengan induknya untuk tumbuh dan berkembang bila diberikan lingkungan yang sesuai.

Namun dalam regenerasi organ bersifat *species-specific*, artinya pada genotipe yang berbeda akan memberikan respon yang juga berbeda. Oleh karena itu perlu mencari prosedur regenerasi secara *in vitro* yang sesuai dengan genotipe tanaman kopi robusta yang ada di Lampung. Sehingga mampu menyediakan bibit dalam jumlah banyak dan mampu meningkatkan produktivitas kopi di Lampung.

Perbanyakan *in vitro* tanaman kopi dapat dilakukan melalui proses regenerasi secara embriogenesis. Embriogenesis somatik dapat terbentuk melalui embriogenesis secara langsung (tanpa melalui tahap induksi kalus) dan tidak langsung (melalui tahap induksi kalus). Embriogenesis secara tidak langsung lebih sering dilakukan karena dapat menghasilkan embrio yang lebih banyak dibandingkan secara langsung. Pembentukan embrio somatik secara langsung

sering ditemukan terhambat karena terjadi browning pada eksplan akibat adanya oksidasi senyawa fenol dari jaringan eksplan. Embriogenesis somatik tidak langsung dilakukan melalui 4 tahapan yaitu induksi kalus primer, induksi kalus embriogenik dari kalus primer dan inisiasi embrio somatik, pematangan embrio somatik (*ES maturation*) dan regenerasi tanaman dari embrio somatik.

Penggunaan media dasar pada tahap induksi kalus primer dan induksi kalus embriogenik memberikan hasil yang berbeda pada tiap jenis medianya. Selain media dasar zat pengatur tumbuh juga mempengaruhi pembentukan kalus primer dan kalus embriogenik.

Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman secara *in vitro* dikendalikan oleh keseimbangan dan interaksi dari zat pengatur tumbuh yang berada dalam eksplan (endogen) dengan zat pengatur tumbuh yang diserap dari media tumbuh (eksogen). Pemberian zat pengatur tumbuh yang tepat akan mempengaruhi pertumbuhan dari kalus. Zat pengatur tumbuh yang sering ditambahkan pada media kultur *in vitro* adalah ZPT golongan auksin dan sitokinin.

Penggunaan auksin dan sitokinin mampu menginduksi kalus embriogenik dalam embriogenesis somatik tanaman kopi. Pada ratio tertentu penggunaan auksin dan sitokinin mampu menstimulasi embriogenesis.

#### **1.4 Hipotesis**

Berdasarkan kerangka pemikiran yang telah dikemukakan, dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

1. Penggunaan jenis eksplan daun dan formulasi media dapat menginduksi kalus primer.
2. Ada perbedaan respons induksi kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) terhadap dua formulasi media.
3. Penggunaan kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan dua formulasi media induksi kalus primer dapat menginduksi kalus embriogenik dan embrio somatik.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Kopi Robusta

Kopi robusta adalah tanaman budidaya berbentuk pohon yang termasuk dalam famili Rubiaceae dan genus *Coffea*. Daunnya berbentuk bulat telur dengan ujung agak meruncing. Daun tumbuh berhadapan dengan batang, cabang, dan ranting-rantingnya. Permukaan atas daun mengkilat, tepi rata, pangkal tumpul, panjang 5-15 cm, lebar 4,0-6,5 cm, pertulangan menyirip, tangkai panjang 0,5-1,0 cm, dan berwarna hijau (Najiyati dan Danarti, 2012).

Klasifikasi kopi menurut Cronquist (1981) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Divisio : Magnoliophyta  
Sub Divisio : Spermatophyta  
Class : Magnoliopsida  
Sub Class : Asteridae  
Order : Rubiales  
Family : Rubiaceae  
Genus : *Coffea*  
Species : *Coffea canephora* Pierre ex Froehner

Kopi merupakan tanaman tahunan yang memiliki 3 organ vegetatif yaitu akar, batang, dan daun. Sistem perakaran pada kopi yaitu sistem perakaran tunggang

yang tidak mudah rebah. Perakaran tanaman kopi relatif dangkal, lebih dari 90% dari berat akar terdapat pada lapisan tanah 0-30 cm (Najiyati dan Danarti, 2012).

Tanaman kopi mempunyai sifat dimorfisme dalam pertumbuhan vegetatifnya, yaitu pertumbuhan tegak (ortotropik) dan pertumbuhan ke samping (plagiotropik) dengan percabangan yang banyak. Batang kopi merupakan tumbuhan berkayu, tumbuh tegak ke atas, dan berwarna putih keabu-abuan. Pada batang, terdapat 2 macam tunas yaitu tunas seri (tunas reproduksi) yang selalu tumbuh searah dengan tempat tumbuh asalnya dan tunas legitim yang hanya dapat tumbuh sekali dengan arah tumbuh yang membentuk sudut nyata dengan tempat aslinya (Arief *et al.*, 2011).

Organ generatif kopi terdiri atas 3 bagian yaitu bunga, buah, dan biji. Bunga pada kopi robusta memiliki ciri yaitu berukuran kecil, mahkotanya berwarna putih dan berbau harum semerbak. Kelopak bunga berwarna hijau. Apabila bunga sudah dewasa, kelopak dan mahkotanya akan membuka dan segera mengadakan penyerbukan kemudian akan terbentuk buah. Waktu yang diperlukan sejak terbentuknya bunga hingga buah menjadi matang  $\pm$  8-11 bulan, tergantung dari jenis dan faktor lingkungannya (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2009). Buah tanaman kopi terdiri dari daging buah dan biji. Daging buah terdiri atas 3 bagian yaitu lapisan kulit luar (eksokarp), lapisan daging (mesokarp), dan lapisan kulit tanduk (endokarp) yang tipis tetapi keras. Buah kopi umumnya mengandung dua butir biji tetapi ada juga buah yang tidak menghasilkan biji atau hanya menghasilkan satu butir biji. Biji kopi terdiri atas kulit biji dan lembaga. Secara



morfologi, biji kopi berbentuk bulat telur, bertekstur keras, dan berwarna putih kotor (Najiyati dan Danarti, 2012).

## **2.2 Teknik Perbanyak Kopi**

Tanaman kopi dapat diperbanyak secara generatif dan vegetatif. Perbanyak secara generatif (menggunakan biji) merupakan cara termurah dan termudah untuk perbanyak tanaman kopi. Perbanyak secara generatif memiliki keuntungan seperti sistem perakaran lebih kuat, lebih mudah diperbanyak dan jangka waktu berbuah lebih panjang. Namun perbanyak secara generatif juga memiliki kelemahan antara lain waktu untuk memulai berbuah lebih lama dan sifat turunan tidak sama dengan induknya dan ada banyak jenis tanaman produksinya sedikit atau benihnya sulit untuk berkecambah (AAK, 2010).

Perbanyak secara vegetatif pada kopi yang pernah dan sering dilakukan adalah dengan cara menyambung dan menyetek. Dari kedua cara tersebut, yang banyak dilakukan secara besar-besaran hanyalah dengan cara menyambung. Sedangkan kegiatan menyetek belum begitu meluas, karena kemungkinan hidup dari bahan stek sangat kecil dan tidak semua jenis dapat disetek (AAK, 2010).

Perbanyak secara vegetatif mempunyai keuntungan seperti lebih cepat berbuah, sifat turunannya sesuai dengan induknya dan dapat digabung sifat-sifat yang diinginkan. Perbanyak secara vegetatif juga mempunyai kelemahan antara lain perakaran kurang baik, lebih sulit dikerjakan karena membutuhkan keahlian tertentu, jumlah tanaman yang diperbanyak bergantung pada jumlah stek yang ditanam, dan jangka waktu berbuah lebih pendek (AAK, 2010).

Salah satu teknik yang memungkinkan untuk dikembangkan dalam rangka menghasilkan bibit kopi yang bersifat unggul, memiliki sifat genetik yang seragam, jumlah yang massal tanpa merusak tanaman induknya serta bibit yang dihasilkan memiliki akar tunggang sehingga kuat dan tahan terhadap kekeringan adalah dengan menggunakan teknik kultur jaringan (Deo *et al.*, 2010).

### **2.3 Kultur Jaringan Kopi**

Embriogenesis somatik adalah teknik perbanyakan tanaman dengan cara menginduksi embrio dari sel somatik tanpa adanya fusi gamet dan dilakukan pada lingkungan yang aseptik (Purnamaningsih, 2002). Jumlah propagul yang dihasilkan dari embrogenesis somatik tidak terbatas (Purnamaningsih, 2002), karena pada embriogenesis, setiap sel pada jaringan yang ditanam berpotensi berkembang menjadi satu individu baru, sehingga kapasitas produksi bibitnya dapat mencapai ratusan ribu hingga jutaan bibit (Roostika *et al.*, 2009).

Dalam pola regenerasi melalui embriogenesis, terdapat beberapa tahapan dari eksplan menjadi tanaman lengkap yang meliputi tahapan induksi kalus, proliferasi kalus, dan diferensiasi kalus menjadi jaringan. Proses pembentukan embrio somatik pada umumnya didahului dengan pembentukan jaringan embriogenik, selanjutnya pembentukan struktur embrio globular, hati, torpedo dan kotiledon (Handayani, 2008).

Tahapan induksi kalus merupakan tahap isolasi eksplan dan penanaman pada media tumbuh untuk menginduksi pembentukan kalus yang bersifat embriogenik (Lubis, 2013). Penanaman tersebut dilakukan pada media tanam yang

mengandung kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin dan sitokinin yang mempunyai konsentrasi tinggi (Purnamaningsih, 2002).

Tahap induksi embrio somatik merupakan tahap penanaman kalus embriogenik ke dalam media tanam. Media tersebut umumnya mengandung kombinasi ZPT auksin dengan konsentrasi rendah dan sitokinin dengan konsentrasi yang tinggi. Dalam proses induksi embrio somatik, embrio dapat berkembang dalam beberapa tahap, yaitu tahap embrio globular, embrio tahap hati, tahap torpedo, embrio tahap kotiledon dan tahap perkecambahan. Menurut beberapa penelitian yang telah dilakukan, tahap perkembangan embrio tersebut merupakan tahap yang paling sulit dalam embriogenesis somatik (Purnamaningsih, 2002).

Arimarsetiowati (2011) menyatakan bahwa pembentukan embrio somatik secara langsung pada eksplan daun *Coffea arabica* bisa terlihat 12 minggu setelah kultur. Pembentukan embrio somatik diawali dengan terbentuknya embrio berbentuk bintik-bintik putih pada eksplan. Selanjutnya kalus yang terbentuk menyebar di sekeliling daun. Kalus tersebut berkembang dan berwarna kecoklatan. Kalus yang berwarna kecoklatan berubah menjadi embrio fase *globular* berwarna putih setelah berumur 6 bulan. Embrio fase *globular* mulai berkembang menjadi fase hati dan torpedo pada umur 7 bulan, selanjutnya embrio fase *globular* mulai memperbanyak diri.

Berdasarkan hasil penelitian Riyadi dan Tirtoboma (2004) bahwa tingkat perkembangan embrio somatik erat kaitannya dengan warna embrio. Embrio pada fase *globular* umumnya berwarna putih kekuningan. Embrio fase *early heart* berwarna kekuningan. Embrio fase *middle heart* berwarna putih.

Bagian organ yang sering digunakan sebagai eksplan dalam kultur jaringan kopi adalah daun muda (Santana *et al.*, 2007). Penggunaan media MS dengan  $\frac{1}{2}$  konsentrasi garam makro dan mikro yang dilengkapi vitamin B5, zat pengatur tumbuh 2,4-D dan kinetin baik secara tunggal maupun kombinasi dapat menginduksi kalus dan massa proembrio dari eksplan daun kopi arabika varietas Sigarar Utang (Ibrahim *et al.*, 2012).

Pada bagian daun yang sudah disayat berhasil membentuk kalus yang kompak dari eksplan daun kopi arabika (Ahmed *et al.*, 2013). Kalus yang terbentuk dalam kultur *in vitro* dibedakan menjadi dua macam, yaitu kalus embriogenik dan kalus non embriogenik. Kalus embriogenik adalah kalus yang memiliki potensi untuk beregenerasi menjadi tanaman melalui embriogenesis. Sedangkan kalus non embriogenik adalah kalus yang tidak mempunyai kemampuan untuk beregenerasi menjadi tanaman (Surbarnas, 2011).

Penggunaan media MS yang diperkaya dengan 1 mg/l 2, 4-D dan 2 mg/l BAP didapatkan persentase pembentukan kalus tertinggi sebesar 96% (Ahmed *et al.*, 2013). Kalus embriogenik terbentuk sebesar 91 % dari eksplan daun kopi arabika dengan menggunakan media MS dengan  $\frac{1}{2}$  konsentrasi garam makro dan mikro dan ditambahkan 1 mg/l 2,4-D dan 1 mg l<sup>-1</sup> kinetin (Etienne *et al.*, 2013).

Hasil penelitian Ibrahim *et al.* (2013) menunjukkan bahwa yang menghasilkan lebih banyak embrio dengan fase globular dan torpedo pada embriogenesis kopi arabika adalah masing-masing dengan perlakuan dengan menggunakan 2,4-D (1 mg/l) + thidiazuron (2 mg/l) dan dengan menggunakan 2,4-D (2 mg/l) + thidiazuron (2 mg/l).

## 2.4 Media Kultur

Media kultur jaringan adalah media tanam yang terdiri dari berbagai komposisi dan macam unsur hara dan sebagainya. Menurut Ryugo (1988) media tanam pada kultur jaringan berisi kombinasi dari asam amino esensial, garam-garam anorganik, vitamin-vitamin, larutan buffer, dan sumber energi (glukosa). Media kultur jaringan merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan dalam perbanyakan tanaman secara *in vitro*.

Menurut Rahardja (1994) untuk membuat media dengan jumlah zat seperti yang ditentukan, diperlukan penimbangan dan penakaran bahan secara tepat. Ketidaktepatan ukuran dapat menyebabkan terjadinya proses yang tidak dikehendaki selama proses pengulturan. Yusnita (2003) menyebutkan, komponen media kultur jaringan tanaman adalah air destilata atau aquades, unsur hara makro dan mikro, sumber karbohidrat (sukrosa), vitamin, asam amino, bahan organik lain seperti mio inositol, zat pengatur tumbuh, bahan suplemen alami (seperti ekstrak malt, air kelapa, jus tomat, dan bubur pisang) dan bahan pemat media (agar-agar atau gelrite).

## 2.5 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

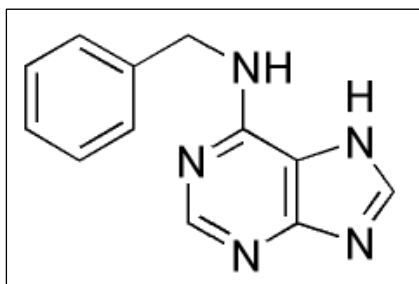
ZPT merupakan komponen penting dalam memberi arah pertumbuhan dan perkembangan sel atau jaringan tanaman. Dua golongan ZPT yang paling berperan dalam proses morfogenesis adalah sitokinin dan auksin. Skoog dan Miller (1957) dalam Yusnita (2003), mengemukakan bahwa regenerasi tunas dan akar *in vitro* dikontrol secara hormonal oleh ZPT sitokinin dan auksin. Sitokinin

dan auksin merupakan dua kelompok ZPT yang merupakan komponen media yang penting dalam kultur jaringan.

Perbandingan sitokinin dengan auksin yang tinggi mampu mendorong pembentukan tunas, sedangkan perbandingan sitokinin dengan auksin yang rendah akan mendorong pembentukan akar, dan jumlah sitokinin dan auksin yang sama dapat mendorong pembentukan kalus. Hubungan antara sitokinin dan auksin dalam mengontrol regenerasi tunas atau akar berlaku untuk berbagai spesies tanaman (Skoog dan Miller, 1957 dalam Yusnita, 2003).

## 2.6 Benzyladenin

Benziladenin (BA) merupakan salah satu jenis sitokinin sintetik yang mempunyai struktur hampir sama dengan kinetin, dengan rumus kimia  $C_{12}H_{11}N_5$  (Gambar 1).

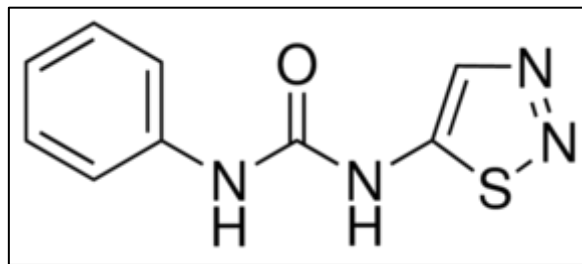


Gambar 1. Rumus bangun Benzyladenin

BA merupakan jenis sitokinin yang sangat aktif dalam merangsang pembelahan sel, pembentukan tunas adventif, poliferasi tunas aksilar, dan menghambat pembentukan akar serta meningkatkan aliran fotosintat (Pierik, 1987). Bobot molekul BA sebesar 225,36 g/mol, dengan konsentrasi 0,5-10 mg/l dapat merangsang multiplikasi tunas aksilar dan relatif mudah diperoleh serta lebih murah jika dibandingkan dengan TDZ (Yusnita, 2003).

## 2.7 Thidiazuron

Thidiazuron (TDZ) merupakan senyawa organik sitokinin sintetis yang memiliki rumus molekul  $C_9H_8N_4O_5$  dengan berat molekul 220, 251 (Gambar 2). TDZ berfungsi dalam memacu perkembangan sel, pembentukan organ serta perkembangan tunas (Salisbury *et al.*, 1995).



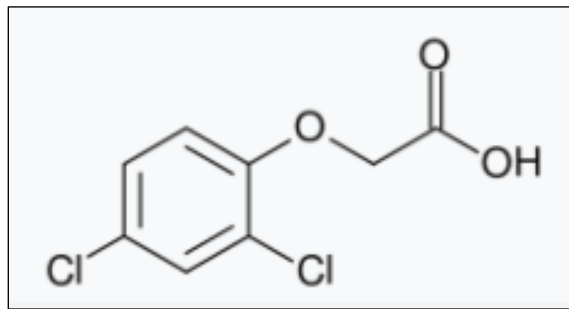
Gambar 2. Rumus bangun Thidiazuron

TDZ memiliki kemampuan untuk menginduksi tunas yang lebih baik dibandingkan dengan sitokinin yang lain seperti zeatin, kinetin ataupun 6-benzylaminopurin. Kemampuan TDZ dalam induksi pembentukan embrio somatik tersebut diduga karena TDZ dapat menempel pada salah satu sisi dari *Cytokinin Binding Protein* (CBP) yang terdapat pada membran sel sehingga mampu merangsang produksi sitokinin endogen (Kusmianto, 2008). Dengan demikian, kadar sitokinin yang meningkat di dalam sel akan memacu terjadinya pembelahan sel maupun merangsang morfogenesis suatu jaringan. TDZ juga mampu menghambat kerja enzim sitokinin oksidase. Enzim tersebut dikenal sebagai enzim yang mampu mendegradasi sitokinin. Dengan demikian terhambatnya kerja enzim tersebut, adanya maka reaktivitas sitokinin menjadi tidak terhambat (Kusmianto, 2008). Adanya enzim sitokinin di dalam sel bersamaan dengan adanya auksin pada konsentrasi tertentu akan menyebabkan

hubungan antar sel menjadi longgar sehingga terinduksi pembentukan embrio-embrio yang baru (Sutanto dan Aziz, 2006).

### 2.8 2,4-Dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D)

2,4-D merupakan auksin tiruan yang paling efektif dalam produksi kultur embriogenik (Bhojwani and Razdan, 1996). Dibandingkan dengan golongan auksin IAA, 2,4-D memiliki sifat lebih stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan oleh sel tanaman ataupun oleh pemanasan pada proses sterilisasi (Indah, 2013). Rumus bangun 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Rumus bangun 2,4-D.

2,4-D telah lama digunakan sebagai salah satu komponen media tumbuh yang mampu menginduksi kalus embriogenik pada berbagai jenis tanaman.

Penambahan 2,4-D dalam media kultur akan dapat merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus (Rahayu *et al.*, 2002).

Mekanisme kerja 2,4-D dalam pembesaran dan pembelahan sel erat kaitannya dengan kemampuan auksin dalam pelonggaran dinding sel. Berdasarkan teori pertumbuhan asam, auksin mampu melonggarkan dinding sel dengan cara



meningkatkan pompa ion  $H^+$  ke dalam dinding sel sehingga menyebabkan pH dinding sel menjadi asam. pH yang asam tersebut menyebabkan enzim-enzim yang berperan dalam degradasi ikatan polisakarida pada dinding sel menjadi aktif dan akan memutus ikatan polisakarida pada dinding sel tersebut. Akibatnya air dapat masuk ke dalam sel dan tekanan turgor naik sehingga menyebabkan dinding sel menjadi longgar (Lestari *et al.*, 2013).

### **III. BAHAN DAN METODE**

Penelitian ini merupakan studi regenerasi *in vitro* tanaman kopi yang terdiri dari 3 percobaan yaitu:

1. Pengaruh jenis eksplan daun dan formulasi media terhadap induksi kalus primer.
2. Respons induksi kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) terhadap dua formulasi media.
3. Pengaruh klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan formulasi media induksi kalus primer terhadap induksi kalus embriogenik pada media embriogenesis.

Ketiga percobaan tersebut dilakukan di Laboratorium Ilmu Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Agustus 2018 hingga Juni 2019.

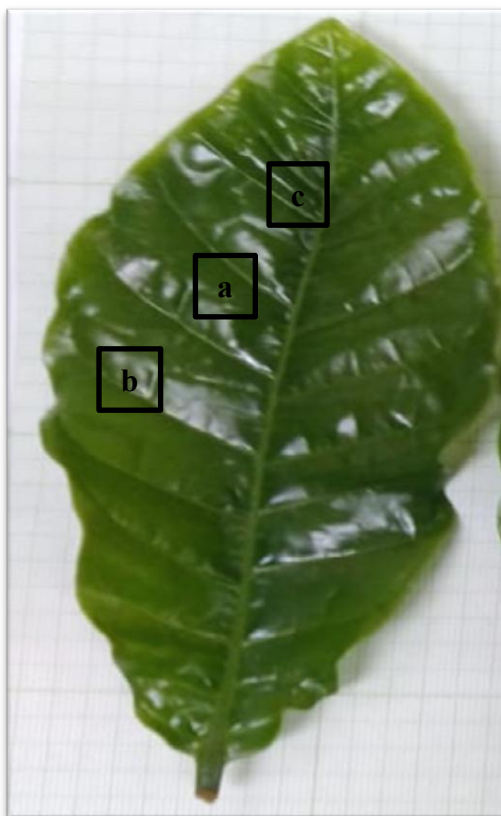
#### **3.1 Percobaan I: Pengaruh jenis eksplan daun dan formulasi media terhadap induksi kalus primer.**

##### **3.1.1 Bahan Tanaman**

Bahan tanaman yang digunakan adalah tanaman kopi klon lokal Lampung. Bibit-bibit unggul klon lokal didapatkan dari hasil eksplorasi di kabupaten Tanggamus dan Lampung Barat. Bibit-bibit ini berupa stek 2-3 buku yang kemudian dirawat di dalam rumah kaca yang diberikan naungan buatan dengan menggunakan paranet. Pemupukan dilakukan 2 kali seminggu dengan menggunakan Growmore

(N-P-K 32-10-10) sebanyak 2 gr/l. Penyiraman dilakukan secara rutin setiap hari. Pengendalian hama dan penyakit menggunakan insektisida curacron (1 ml/l) dan fungisida dithane (2 gr/l) yang disemprotkan dan diaplikasikan setiap minggu.

Eksplan yang digunakan adalah daun muda berwarna hijau muda yang sudah berkembang penuh dengan ukuran panjang daun 7-12 cm. Daun yang digunakan adalah daun yang berada pada posisi kedua sampai ketiga dari atas tanaman (Priyono *et al.*, 2010). Bagian daun yang digunakan sebagai eksplan adalah bagian daun yang tidak memiliki tulang daun (TTD), bagian daun dengan tulang daun di bagian samping (TDS), dan bagian daun dengan tulang daun di bagian tengah (TDT) (Gambar 4).



Gambar 4. Daun muda kopi yang digunakan sebagai eksplan. (a) TDT, (b) TDS, (c) TTD.

### 3.1.2 Sterilisasi Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah daun muda yang masih berwarna hijau muda. Daun dibersihkan dengan menggunakan deterjen dan dibilas dengan air sebanyak tiga kali. Selanjutnya daun direndam dengan menggunakan dithane (2 gr/l) selama 15 menit. Daun kemudian dibawa ke dalam *laminar air flow cabinet* (LAFC), dipotong menjadi tiga bagian kemudian direndam dengan ethanol 70% selama 3 detik dan dibilas menggunakan air steril. Daun kemudian dimasukkan ke dalam larutan natrium hypochlorite 0,5% yang telah ditambahkan dengan Tween 20 sebanyak 3 tetes dan dikocok menggunakan tangan selama 7 menit lalu dibilas menggunakan air steril sebanyak 3 kali. Eksplan kemudian dipotong dengan ukuran 0,5 cm X 0,5 cm.

### 3.1.3 Media Kultur

Untuk induksi kalus digunakan 3 jenis media dasar yang ditunjukkan pada Tabel 1 yaitu NPCM (*New Primary Culture Medium*),  $\frac{1}{4}$  MS dan  $\frac{1}{2}$  MS. Media NPCM merupakan media modifikasi dari Murashige and Skoog (1962) (Samson *et al.*, 2006) (Tabel lampiran 6). Media dasar  $\frac{1}{4}$  MS adalah media Murashige dan Skoog (1962) yang dimodifikasi unsur makro dan mikro menjadi seperempatnya, sedangkan  $\frac{1}{2}$  MS menjadi setengahnya. Ketiga media dasar ini diperkaya dengan thiamine-HCL (15 mg/l), asam nikotinat (1 mg/l), piridoksin-HCL (1 mg/l) dan mio inositol (130 mg/l) (Samson *et al.*, 2006). Bahan lain yang dtambahkan adalah sukrosa 30 g/l, asam askorbat 200 mg/l dan asam sitrat 150 mg/l. Selanjutnya pH media diatur menjadi 5,8. Jika pH kurang dari 5,8 maka diberi penambahan KOH 1 N sedangkan jika pH lebih dari 5,8 maka diberi HCL 1 N. Setelah pH menjadi 5,8 ditambahkan 7 g/l bubuk agar-agar kemudian media

dimasak hingga mendidih lalu media dituangkan ke dalam botol-botol kultur sebanyak 20 ml per botol. Botol berisi media ditutup dengan plastik bening kemudian diikat dengan karet dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,2 kg/cm<sup>2</sup> selama 7 menit.

Tabel 1. Media induksi kalus primer

Jenis potongan daun	Jenis Media
TDT	N1D1T2
	N1D2T2
	M1D1T2
	M1D2T2
	M1B1
	M2B1
TDS	N1D1T2
	N1D2T2
	M1D1T2
	M1D2T2
	M1B1
	M2B1
TTD	N1D1T2
	N1D2T2
	M1D1T2
	M1D2T2
	M1B1
	M2B1

**Keterangan:**

N1D1T2	: NPCM + 1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l TDZ
N1D2T2	: NPCM + 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l TDZ
M1D1T2	: ¼ MS + 1 mg/l 2,4-D + 2 mg/l TDZ
M1D2T2	: ¼ MS + 2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l TDZ
M1B1	: ¼ MS + 1 mg/l BA
M2B2	: ½ MS + 1 mg/l BA

### 3.1.4 Penanaman Eksplan dan Ruang Kultur

Penanaman eksplan dilakukan secara *adaxial faces on medium* (permukaan atas daun menyentuh pada media). Penanaman eksplan steril dan subkultur dilakukan di dalam LAFC dengan kondisi aseptik. Eksplan dikulturkan dalam ruang kultur dengan kondisi ruangan gelap pada suhu 25°C ± 2°C.

### 3.1.5 Rancangan Percobaan

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Setiap unit percobaan terdiri dari 1 botol kultur yang masing-masing berisi 5 eksplan, dengan perlakuan 3 jenis potongan daun dan 6 jenis formulasi media (Tabel 1.). Data persentase eksplan berkalus dan skoring banyaknya kalus primer yang terbentuk pada 4 MST dianalisis menggunakan *standar error* (SE) menurut Walpole (1997) dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$SE = \sqrt{\frac{\sum(x_i)^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}}{n(n-1)}}$$

### 3.1.6 Pengamatan

Pada Percobaan I ini dilakukan pengamatan terhadap perkembangan kultur, penentuan eksplan berkalus dan banyaknya kalus yang terbentuk pada setiap eksplan pada umur 4 MST. Pengamatan secara visual dilakukan setiap minggu setelah penanaman selama 4 minggu untuk melihat perkembangan kalus.

Persentase eksplan berkalus dilakukan dengan menghitung banyaknya eksplan yang membentuk kalus pada minggu ke 4 dibagi dengan total jumlah eksplan yang ditanam. Banyaknya kalus yang terbentuk ditentukan dengan skoring (Gambar 5) dengan kriteria skor sebagai berikut :

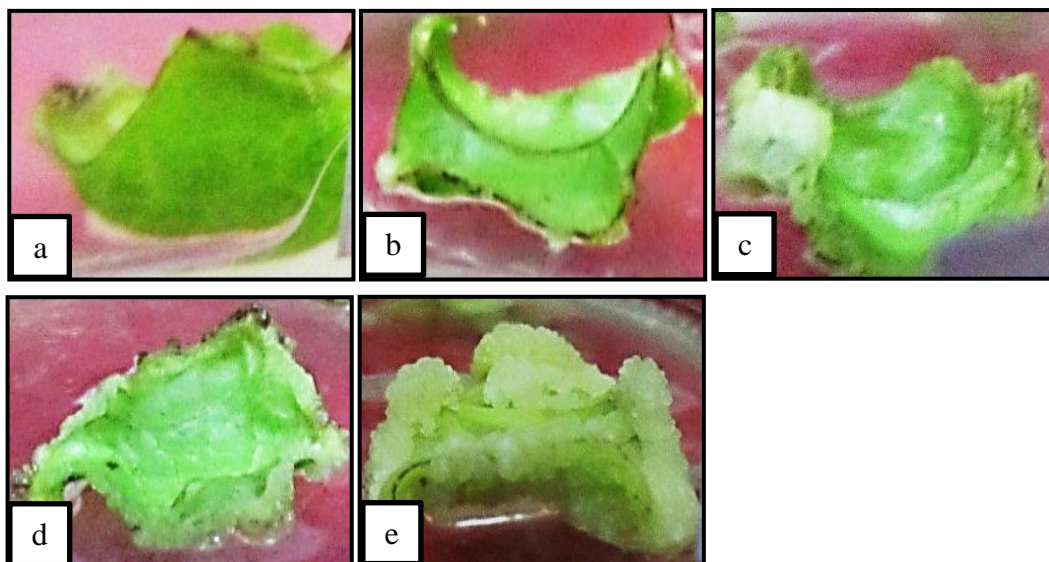
Skor 0 : Eksplan tidak membentuk kalus sama sekali

Skor 1 : Eksplan membentuk kalus sedikit ( sampai 10% dari pinggiran daun membentuk kalus)

Skor 2 : Eksplan membentuk kalus sedang ( 11-45% dari pinggiran daun membentuk kalus)

Skor 3 : Eksplan membentuk kalus banyak ( 46-75% dari pinggiran daun membentuk kalus)

Skor 4 : Eksplan membentuk kalus sangat banyak ( >75% dari pinggiran daun membentuk kalus)



Gambar 5. Kalus yang terbentuk pada eksplan daun kopi robusta (a) Skor 0, (b) Skor 1, (c) Skor 2, (d) Skor 3, (e) Skor 4.

### 3.2 Percobaan II: Respons induksi kalus primer dari klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) terhadap dua formulasi media.

#### 3.2.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah tanaman kopi klon Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari. Klon Komari Tugino dan Siswanto (Gambar 6) didapatkan dari kabupaten Tanggamus sedangkan Tugu Sari didapatkan dari kabupaten Lampung Barat. Eksplan yang digunakan adalah daun muda berwarna hijau muda yang sudah berkembang penuh, yang dipotong menjadi berukuran lebih kurang 0,5 x 0,5 cm.



Gambar 6. Keragaan tanaman kopi robusta klon unggul lokal Lampung  
(a) Tugino, (b) Siswanto, (c) Komari.

### 3.2.2 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi eksplan dilakukan sama dengan Percobaan I.

### 3.2.3 Media Kultur

Pembuatan media kultur dilakukan sama dengan Percobaan I.



### **3.2.4 Penanaman Eksplan dan Ruang Kultur**

Penanaman eksplan dan kondisi ruang kultur dilakukan sama dengan Percobaan I. Eksplan dikulturkan selama 4 minggu pada media induksi pembentukan kalus, lalu disubkultur ke media pembentukan kalus embriogenik.

### **3.2.5 Rancangan Percobaan**

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Perlakuan disusun dengan menggunakan 4 klon kopi robusta dan 2 jenis formulasi media terbaik yang didapatkan dari Percobaan I. Setiap unit percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang masing-masing berisi 5 eksplan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *standar error* (SE) (Walpole, 1997).

### **3.2.6 Pengamatan**

Pengamatan dilakukan sama dengan pengamatan pada Percobaan I.

## **3.3 Percobaan III: Pengaruh klon kopi robusta (Komari, Tugino, Siswanto dan Tugu Sari) dan formulasi media induksi kalus primer terhadap induksi kalus embriogenik pada media embriogenesis.**

### **3.3.1 Bahan Tanaman**

Bahan tanaman yang digunakan adalah kalus primer umur 4 MST yang terbentuk pada dua media terbaik pada Percobaan II .

### **3.3.2 Media Kultur**

Media kultur yang digunakan adalah media dasar E (Tabel lampiran 7) dengan penambahan 1 mg/l 2,4-D dan 4 mg/l BA yang diperkaya dengan thiamine-HCL (20 mg/l), glysin (20 mg/l), cystein (40 mg/l), adenin (22 mg/l), mio inositol (200 mg/l), malt extract (800 mg/l) dan kasein hidrolisat (200 mg/l) (Samson *et al.*,

2006). Bahan lain yang ditambahkan adalah sukrosa 30 g/l, asam askorbat 200 mg/l dan asam sitrat 150 mg/l. (Samson *et al.* 2006). Pembuatan media kultur dilakukan sama dengan Percobaan I.

### **3.3.3 Penanaman Eksplan dan Ruang Kultur**

Kalus primer umur 4 MST yang terbentuk pada Percobaan II dipindahkan ke media induksi kalus embriogenik yaitu media dasar E dengan penambahan 1 mg/l 2,4-D dan 4 mg/l BA (Samson *et al.* 2006). Kultur diletakkan dalam ruang kultur dengan kondisi ruangan gelap pada suhu  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Subkultur dilakukan setiap 4 minggu sekali pada media yang sama. Pada subkultur ketiga embrio somatik yang terbentuk dari media E disubkultur ke media R (Tabel lampiran 8) sampai membentuk tunas.

### **3.3.4 Rancangan Percobaan**

Percobaan ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 3 ulangan. Perlakuan disusun dengan menggunakan 4 klon kopi robusta dan 2 jenis formulasi media terbaik dari Percobaan I. Setiap unit percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang masing-masing berisi 5 eksplan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *standar error* (SE) (Walpole, 1997).

### **3.3.5 Pengamatan**

Pengamatan dilakukan secara visual pada kalus embriogenik yang terbentuk pada umur 8, 12 dan 16 MST dan menghitung persentase kalus primer yang membentuk kalus embriogenik dan embrio somatik.

## V. KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian ini kesimpulan yang dapat diperoleh adalah :

1. Eksplan daun dengan tulang daun di bagian tengah dan bagian samping yang dikulturkan pada media  $\frac{1}{2}$  MS + 1mg/l BA dan pada media NPCM + 1mg/l 2,4-D + 2mg/l TDZ menunjukkan persentase pembentukan kalus primer yang paling tinggi yaitu masing-masing sebesar 100%. Media NPCM + 1mg/l 2,4-D + 2mg/l TDZ menginduksi ukuran kalus yang paling tinggi yang ditunjukkan dengan nilai skor sebesar  $3,87 \pm 0,07$ .
2. Eksplan dari klon Komari dan Siswanto yang dikulturkan pada media NPCM + 1mg/l 2,4-D + 2mg/l TDZ menghasilkan ukuran kalus primer yang paling tinggi yang ditunjukkan dengan nilai skor sebesar  $4,00 \pm 0,00$ .
3. Kalus primer dari klon Komari yang diinduksi pada media NPCM + 1mg/l 2,4-D + 2mg/l TDZ menghasilkan kalus embriogenik (12MST) dan embrio somatik (16 MST) dengan persentase tertinggi masing-masing sebesar 82,86% dan 44,83%.

## **5.2 Saran**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai komposisi media dasar beserta kombinasi zat pengatur tumbuh selain BA dan 2,4-D + TDZ, yang mampu menstimulasi kalus primer untuk berkembang menjadi kalus embriogenik pada klon Tugino dan Siswanto.

## DAFTAR PUSTAKA

- AAK. 2010. *Budidaya Tanaman Kopi*. Kanisius. Yogyakarta.
- Ahmed W., T. Feyissa and T. Disasa. 2013. Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 88 (4) : 469–475.
- Anim-Kwapong, G.J., E. Anim-Kwapong and F.K. Opong. 2010. Evaluation of some robusta coffee (*Coffea canephora* pierre ex Froehner) clones for optimal density and planting in Ghana. *African Journal Agriculture Research*. 5(1) : 84-89.
- Ardiyani, F. and S. Pancaningtyas. 2017. Morphological Variation of Somatic Embryos of *Coffea arabica* L. during some sub-culture periods. *Pelita Perkebunan*. 33 (2) : 9-108.
- Arief, M.C.W., M. Tarigan., R. Saragih dan F. Rahmadani. 2011. *Panduan Sekolah Lapangan Budidaya Kopi Konservasi*. Conservation International Indonesia. Jakarta.
- Arimarsetiowati, R. 2011. Pengaruh auksin 2,4-D dan sitokinin 2-IP terhadap pembentukan embriogenesis somatik langsung pada eksplan daun *Coffea arabica* L. *Pelita Perkebunan*. 27 (2) : 68-77.
- Bhojwani, S.S. and M.K. Razdan. 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and practice, a Revised Edition*. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- BPS. 2017. Ekspor Kopi Menurut Negara Tujuan Utama 2000-2015. <https://www.bps.go.id/statictable/2014/09/08/1014/ekspor-kopi-menurut-negara-tujuan-utama-2000-2017.html>. (Diakses pada 12 April 2019, 19.55 WIB).
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York.
- Das, S., S. Ray, S. Dey and S. Dasgupta. 2001 Optimisation of sucrose, inorganic nitrogen and abscisic acid levels for *Santalum album* L. somatic embryo production in suspension culture. *Process Biochemistry*. 37 (1) : 51-56.

- Deo, P.C., A.P. Tyagi, M. Taylor, R. Harding, and D. Becker. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*. 28 (1) : 27-40.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2017. Statistik perkebunan indonesia 2014-2016. Direktorat Jenderal Perkebunan. Jakarta.
- Ducos J.P., R. Alenton, J.F. Reano, C. Kanchanomai, A. Deshayes and V. Pétiard. 2003. Agronomic performance of *Coffea canephora* P. trees derived from large-scale somatic embryo production in liquid medium. *Euphytica*. 131: 215-223.
- Ducos, J.P., G. Labbe, C. Lambot and V. Pétiard. 2007. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 43 : 652-659.
- Elkonin, A.L. and N.V. Pakhomova. 2000. Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 61 : 115-123.
- Erdiansyah, N.P., R. Hulupi, S. Abdoellah. 2016. Penanaman kopi. Dalam kopi: Sejarah, Botani, Proses Produksi, Pengolahan, Produk Hilir dan Sitem Kemitraan (Editor: T. Wahyudi, Pujiyanto, Misnawi). Pusat penelitian kopi dan kakao indonesia. Gajah Mada University Press.
- Etienne H., B. Bertrand, F. Georget, M. Lartaud, F. Montes, E. Dechamp, J. L. Verdeil and D. B. Etienne. 2013. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology*. 00 : 1-14.
- Handayani, T., 2008. *Potensi Embriogenesis Beberapa Genotip Kedelai Toleran dan Peka Naungan*. IPB. Bogor.
- Hendaryono, D.P.S. dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan: Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif Modern*. Kanisius. Yogyakarta.
- Ibrahim, M.S.D., Sudarsono, Rubiyo dan Syafaruddin. 2012. Pengaruh komposisi media terhadap pembentukan kalus embriogenesis somatik kopi arabika (*Coffea arabica*). *Buletin RISTRI*. 3 (1) : 13-22.
- Ibrahim M.S.D., Rr. S. Hartati, Rubiyo, A. Purwito and Sudarsono. 2013. Direct and indirect somatic embryogenesis on arabica coffee (*Coffea arabica*). *Indones. Journal of Agricultural Science*. 14 (2) : 79-86.

- Ibrahim M.S.D. dan Rr. S. Hartati. 2017. Peningkatan induksi kalus embriogenik dan konversi embrio somatik kopi robusta klon BP 308. *Jurnal Tanaman Industri dan Penyegar*. 4 (3) : 121-132.
- 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). *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2 (1) : 1-6.
- Kusmianto, J. 2008. Pengaruh Thidiazuron tunggal dan kombinasi Thidiazuron dan Benzilaminopurin terhadap pembentukan tunas dari potongan daun *Dendrobium antennatum* L. secara *In vitro*. *Skripsi*. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Lestari, E., T. Nurhidayati dan S. Nurfadilah. 2013. Pengaruh konsentrasi ZPT 2,4-D dan BAP terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji *Dendrobium laxiflorum* secara *In vitro*. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*. 2 (1) : 2337-3520.
- Mahadi I., W. Syafi'i dan Y. Sari. 2016, Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode *in vitro*. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 21 (2) : 84-89.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15 (3) : 473-497.
- Najiyati, S dan Danarti. 2012. Kopi. *Budidaya dan Penanganan Lepas Panen*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Nazza, Y., 2013. Induksi Kalus Pegagan (*Centella asiatica*) pada Media MS dengan Penambahan Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D yang Dikombinasi dengan Air Kelapa. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Pierik, R. L. M. 1987. *In vitro culture of higher plants*. Martinus Nijhoff Publishers. Boston.
- Priyono, B. Florin, M. Rigoreau, J.P. Ducos, U. Sumirat, S. Mawardi, C. Lambot, P. Broun, V. Pe'tiard, T. Wahyudi and D. Crouzillat. 2010. Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre. *Plant Cell Reports*. 29 : 343-357.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalikannya. *Buletin Agronomika Biologi*. 5 (2) : 51-58.

- Rachmadi, M. 2000. *Pengantar Pemuliaan Tanaman Membiak Vegetatif*. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Rahardja, P. C. 1994. *Kultur Jaringan Teknik Perbanyakan Tanaman secara Modern*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Rahardjo, P. 2012. *Panduan Budidaya dan Pengolahan Kopi Arabika dan Robusta*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Rahayu, B., Solichatun dan E. Anggarwulan. 2002. Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus Serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L.. *Biofarmasi*. 1(1) : 1-6.
- Ramadiana, S., D. Hapsoro dan Y. Yusnita. 2018. Morphological variation among fifteen superior robusta coffee clones in Lampung Province, Indonesia. *Biodiversitas*. 19 (4) : 1475-1481.
- Riyadi I. dan Tirtoboma. 2004. Pengaruh 2,4-D terhadap Induksi Embrio Somatik Kopi Arabika. *Buletin Plasma Nutfah*. 10 (2) : 82-89.
- Roostika, I., V.N. Arief dan N. Sunarlim. 2009. Regenerasi kultur lengkung daratan rendah cv. Diamond river melalui embriogenesis somatik. *Jurnal Hortikultura*. 19 (1) : 14-22.
- Ryugo, K. 1988. *Fruit Culture*. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Salisbury, B. F., C.W. Ross dan D.R. Lukman. 1998. *Fisiologi Tumbuhan* Jilid 3. ITB. Bandung.
- Samson N. P., C. Campa, L. Le Gal, M. Noirot, G. Thomas, T. S. Lokeswari and A.de Kochko. 2006. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different Coffea species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 86 : 37-45.
- Santana-Buzzy, N., R. Rojas-Harera, R.M. Galaz-Avalos, J.R. Ku-Cauich. J. Mijangos-Cortes, L.C. Gutierrez-Pacheco, A. Canto, F. Quiroz-Figueroa, and V.M. Loyola-Vargas. 2007. Advances in coffee tissue culture and its practical implcatons. *In Vitro Cell and Developmental Biology. Plant*. 43 : 507-520.
- Santos-Briones, C. D. L. and S. M. T. Hernandez-Sotomayor. 2006. Coffee biotechnology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 18 (1): 217-227.
- Surbarnas, A., 2011. *Produksi Katarantin Melalui Kultur Jaringan*. CV. Lubuk Agung. Bandung.



- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman secara In Vitro*. Kanisius. Yogyakarta.
- Sutanto, A. dan M. A. Aziz. 2006. Induksi dan regenerasi embriogenesis somatik pepaya. *Jurnal Hortikultura*. 16 (2) : 89-95.
- USDA. 2018. Coffee: world markets and trade. Usda foreign agricultural service, December 2018. <http://www.fas.usda.gov/data/coffee-world-markets-and-trade>. (Diakses pada 12 April 2019, 19.55 WIB).
- Walpole, R.E. 1997. Pengantar Statistika. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Yelnititis. 2012. Pembentukan kalus remah dari eksplan daun ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. 6 : 181-194.
- Yuliarti, N. 2010. *Kultur Jaringan Tanaman : Skala Rumah Tangga*. Lily Publisher.
- Yusnita. 2003. *Kultur Jaringan : Cara Memperbanyak Tanaman Secara Efisien*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Yusnita. 2015. *Kultur Jaringan Tanaman : Sebagai Teknik Penting Bioteknologi Untuk Menunjang Pembangunan Pertanian*. Universitas Lampung. Bai Lampung.
- Yuwono, T. 2008. *Bioteknologi Pertanian*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.