

## EFISIENSI MEDIA KULTUR DAN APLIKASI *TEMPORARY IMMERSION SYSTEM* PADA EMBRIOGENESIS SOMATIK KOPI ARABIKA

### *Efficiency of Culture Media and Application Temporary Immersion System on Somatic Embryogenesis Arabica Coffee*

MEYNARTI SARI DEWI IBRAHIM<sup>1)</sup>, RR. SRI HARTATI<sup>2)</sup>, RUBIYO<sup>3)</sup>,  
AGUS PURWITO<sup>4)</sup>, dan SUDARSONO<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar  
Jalan Raya Pakuwon km 2 Parungkuda-Sukabumi 43357

<sup>2)</sup>Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan  
Jalan Tentara Pelajar No. 1 Cimanggu, Bogor, 16111

<sup>3)</sup>Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian  
Jalan Tentara Pelajar No. 4 Cimanggu, Bogor, 16111

<sup>4)</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB  
Darmaga Campus, Bogor 16680

email: meynartisaya@yahoo.com

Diterima: 30-12-2016; Direvisi: 13-02-2017; Disetujui: 24-03-2017

#### ABSTRAK

Perkembangan dan pertumbuhan embriogenesis somatik memerlukan sukrosa sebagai sumber karbon, dan bahan pematid untuk memadatkan media. Harga sukrosa dan phytigel yang mahal merupakan kendala dalam perbanyakan tanaman menggunakan teknik embriogenesis somatik. Penelitian bertujuan untuk mengkaji kemungkinan penggunaan gula pasir dan agar-agar komersial dalam embriogenesis somatik kopi Arabika. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian dari Mei 2013 sampai Juni 2015. Tahap pertama, kalus disubkultur ke media regenerasi. Perlakuan yang diuji pemberian sukrosa 35 g L<sup>-1</sup> + phytigel 2,5 g L<sup>-1</sup> dan gula pasir 35 g L<sup>-1</sup> + (phytagel 2,5 g L<sup>-1</sup> atau agar-agar komersial 9,0 g L<sup>-1</sup>). Tahap kedua, embrio fase torpedo disubkultur ke media perkecambahan. Perlakuan yang diuji pemberian sukrosa 40 g L<sup>-1</sup> + phytigel (2,5 g L<sup>-1</sup> atau 1,5 g L<sup>-1</sup>), dan gula pasir 40 g L<sup>-1</sup> + (phytagel 2,5 g L<sup>-1</sup> atau agar-agar komersial 9,0 g L<sup>-1</sup>). Tahap ketiga torpedo disubkultur ke *Temporary Immersion System (RITA)*<sup>®</sup>. Perlakuan yang diuji adalah pemberian sukrosa dan gula pasir. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan 10, 20 dan 3 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gula pasir dan agar-agar komersial tidak dapat menggantikan sukrosa dan phytigel pada media regenerasi kalus kopi Arabika karena dapat menurunkan bobot basah kalus dan jumlah embrio somatik. Pada media perkecambahan pemberian gula pasir+phytagel masih dapat direkomendasikan, tetapi tidak untuk penggunaan gula pasir+agar-agar komersial. Pemakaian gula pasir pada RITA<sup>®</sup> dapat digunakan karena tidak memberikan hasil yang berbeda nyata untuk semua peubah yang diamati.

Kata kunci: Agar-agar komersial, *Coffea arabica* L., embriogenesis somatik, gula pasir, RITA<sup>®</sup>

#### ABSTRACT

In vitro culture requires sucrose as carbon source and gelling agent for condensing media. The price of sucrose and phytigel were quite expensive, causing difficulties in plant propagation using somatic embryogenesis technique. The purpose of this study was to examine the possibility to utilize sugar and commercial agar in somatic embryogenesis

of Arabica coffee. The study was conducted in the Agricultural Superior Seed Development Unit, Indonesian Center Estate Crops Research and Development from May 2013 to June 2015. The first stage, calli were transferred into regeneration medium with tested added sucrose 35 g L<sup>-1</sup> + phytigel 2.5 g L<sup>-1</sup>, and sugar 35 g L<sup>-1</sup> + (phytagel 2.5 g L<sup>-1</sup> or commercial agar 9.0 g L<sup>-1</sup>). In the second one, torpedo stage embryos transferred into media germination with examined sucrose 40 g L<sup>-1</sup> + phytigel (2.5 g L<sup>-1</sup> or 1.5 g L<sup>-1</sup>), sugar 40 g L<sup>-1</sup> + (phytagel 2.5 g L<sup>-1</sup> or commercial agar 9.0 g L<sup>-1</sup>). The third stage, torpedos transferred into *Temporary Immersion System (RITA)*<sup>®</sup>, treatment examined sucrose and sugar. Experiments were arranged in completely randomized design with 10, 20 and 3 replication. The results showed sugar and commercial agar could not substitute sucrose and phytigel on regeneration media because it can reduce calli fresh weight and number of somatic embryos. The germination stage, sugar + phytigel can still be recommended, but not for sugar + commercial agar. Sugar in RITA<sup>®</sup> may be used because had no significant effect on all parameters observed.

Keywords: *Coffea arabica* L., commercial agar, RITA<sup>®</sup>, somatic embryogenesis, sugar.

#### PENDAHULUAN

Embriogenesis somatik kopi Arabika memerlukan nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan dari fase sel sampai menjadi planlet. Komponen media kultur yang diperlukan tidak hanya unsur hara makro, mikro, dan vitamin saja, tetapi harus dilengkapi dengan sukrosa. Pemberian sukrosa dalam media kultur sangat diperlukan dalam pertumbuhan dan perkembangbiakan kultur. Sebagian besar tanaman pada kultur *in vitro* melalui aktivitas fotosintesis hanya mampu menyediakan karbohidrat dalam jumlah sedikit. Hal ini dikarenakan planlet yang dihasilkan bersifat autotropik (George et al. 2008).

Sukrosa adalah salah satu jenis karbon yang banyak digunakan sebagai sumber energi, dan telah digunakan dalam kultur *in vitro* untuk berbagai tujuan. Selain sebagai sumber energi, sukrosa juga berperan sebagai senyawa osmotikum, pelindung stress, molekul sinyal pada tanaman (Lipavská and Konrádová 2004; George et al. 2008), dan mendukung pertumbuhan jaringan tanaman (Swamy et al. 2010), serta pada species tanaman yang sulit diperbanyak secara *in vitro* dapat membantu memaksimalkan aktivitas zat pengatur tumbuh (Ramage and Williams 2002). Pada kultur *in vitro* sukrosa pada umumnya diberikan dalam jumlah 2 - 5% (George et al. 2008). Dalam kultur *in vitro* kopi melalui embriogenesis somatik, sukrosa diberikan pada kisaran 2 - 4% tergantung pada tahap perkembangan embrio (Etienne 2005; Samson et al. 2006; Rezende et al. 2012).

Sukrosa yang digunakan pada kultur *in vitro* merupakan disakarida yang terdiri dari glukosa dan fruktosa. Sama seperti gula pasir, sukrosa bahan baku utamanya adalah tebu. Perbedaan keduanya adalah pada tingkat kemurniannya. Sukrosa mempunyai tingkat kemurnian lebih tinggi dari gula pasir komersial, dapat diautoklaf selama 15 - 20 menit pada suhu maksimum 121°C. Apabila melebihi batas tersebut kemungkinan akan terjadi hidrolisis untuk beberapa glukosa dan fruktosa, tergantung pada seberapa cepat kenaikan suhu dan tekanan yang didapatkannya. Hal ini perlu diperhatikan untuk terjadinya pembentukan karamel pada media kultur (Sigma-Aldrich 2017a).

Jenis dan konsentrasi bahan pematat (agar) di dalam kultur *in vitro* juga dilaporkan berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan (Cardoso et al. 2007). Keberadaan agar diperlukan untuk memadatkan media dengan tujuan supaya eksplan tetap bisa berada dipermukaan media. Konsentrasi agar yang diperlukan sangat tergantung dari jenis agar yang digunakan. Dalam kultur *in vitro* beberapa jenis pematat yang biasa digunakan diantaranya adalah agar, bacto agar, agarose, gellan gum, dan gelrite (George et al. 2008). Beberapa peneliti terdahulu telah menggunakan berbagai jenis agar pada kultur *in vitro* kopi. Rezende et al. (2012) menggunakan phytigel sebanyak 3,4 g L<sup>-1</sup> pada kultur *in vitro* kopi. Ibrahim et al. (2015), Ibrahim et al. (2013) dan Etienne (2005) menggunakan phytigel 2,5 g L<sup>-1</sup> untuk menginduksi kalus embriogenik dan perkembangan embrio somatik kopi. Gatica-arias et al. (2008) menggunakan Gelrite 2,0 g L<sup>-1</sup> untuk perkecambahan biji, 2,5 g L<sup>-1</sup> dalam menginduksi kalus dan perkembangan embrio somatik kopi, sementara Priyono (2010) menggunakan 8,0 g L<sup>-1</sup> bacto agar untuk induksi kalus dan 3,0 g L<sup>-1</sup> Gelrite dalam perkembangan embrio somatik kopi.

Agar-agar pada umumnya yang dihasilkan oleh rumput laut atau sintesisnya, sedangkan phytigel merupakan bahan pengganti agar-agar yang dihasilkan dari fermentasi bakteri. Terdiri dari asam glukuronat, rhamnosa dan glukosa. Gelnya membeku pada suhu 27 - 32°C, tidak berwarna dan mempunyai kekuatan yang tinggi sehingga

dapat mendeteksi kontaminasi mikroba (Sigma-Aldrich 2017b).

Di negara berkembang seperti Indonesia, biaya komponen media yang tinggi sering menjadi kendala di dalam perbanyakan kopi melalui embriogenesis somatik. Besarnya biaya untuk pembelian bahan kimia dan harga yang tergantung dengan nilai tukar rupiah, serta masa pemesanan yang lama menjadi faktor pembatas yang terkadang sangat menyulitkan dalam proses kultur *in vitro*. Salah satu bahan kultur *in vitro* yang paling banyak diperlukan dalam pembuatan media adalah sukrosa. Sumber karbon seperti sukrosa berkontribusi sekitar 34% dari biaya produksi. Tidak hanya sukrosa, agar-agar pematat seperti phytigel juga dibutuhkan dalam jumlah yang tidak sedikit. Penggantian sukrosa menjadi gula pasir dan phytigel menjadi agar-agar komersial diharapkan dapat menekan biaya dalam pembuatan media kultur.

Dalam perbanyakan massal disamping harga media, penggunaan alat tertentu untuk tujuan mempermudah penanganan kultur biasanya akan menjadi pertimbangan tersendiri. Di laboratorium ternama penggunaan *Temporary Immersion System* sudah diaplikasikan untuk perbanyakan kultur kopi, namun dalam aplikasinya belum ada yang menggunakan gula pasir.

Pada penelitian terdahulu penggunaan beberapa bahan pematat seperti phytigel, gelrite, gellan gum, dan agar telah digunakan dalam pembentukan kalus dan perkembangan embrio kopi, sementara penggunaan gula pasir dan agar-agar komersial untuk meminimalkan pengeluaran belanja kultur belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkaji kemungkinan penggunaan gula pasir dan agar-agar komersial dalam embriogenesis somatik kopi Arabika. Disamping penggunaan media padat, kemungkinan penggantian sukrosa menjadi gula pasir dalam media cair pada *Temporary Immersion System* (RITA<sup>®</sup>) juga dicobakan.

## BAHAN DAN METODA

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, dari bulan Mei 2013 sampai Juni 2015. Materi yang digunakan adalah kalus embriogenik dari kopi Arabika Varietas AS2K. Penelitian terdiri atas tiga tahap kegiatan yaitu :

### 1. Respon Kalus Embriogenik terhadap Penggunaan Gula Pasir dan Agar-Agar Komersial

Kalus embriogenik kopi Arabika disubkultur ke media MS dengan 1/2 konsentrasi garam makro dan mikro, vitamin B5 (yang dimodifikasi) serta diberi penambahan zat pengatur tumbuh kinetin 9,30 µM. Perlakuan yang diuji adalah media dengan pemberian; a) sukrosa (Sigma-Aldrich) 35 g L<sup>-1</sup> + phytigel (Sigma-Aldrich) 2,5 g L<sup>-1</sup>, b) gula pasir 35 g L<sup>-1</sup> + phytigel 2,5 g L<sup>-1</sup>, dan c) gula pasir 35 g L<sup>-1</sup> + agar-agar komersial (Swallow) 9,0 g L<sup>-1</sup>. Masing-

masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali, setiap ulangan terdiri atas satu botol yang berisi *klam* kalus dengan berat masing-masing  $\pm 0,2$  g kalus, sehingga untuk masing-masing perlakuan dikulturkan sebanyak  $\pm 2$  g kalus. Total kalus yang dibutuhkan  $\pm 10$  g. Kultur diinkubasi dalam ruangan gelap dengan suhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$ .

Analisis statistik menggunakan rancangan acak lengkap. Jika hasilnya menunjukkan perbedaan yang nyata akan dilakukan uji lanjut menggunakan uji jarak dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%. Peubah yang diukur adalah berat kalus dan persen kalus yang membentuk embrio somatik.

## 2. Respon Embrio Somatik terhadap Penggunaan Gula Pasir dan Agar-Agar Komersial pada Media Perkecambahan

Embrio somatik kopi Arabika fase torpedo disubkultur pada media perkecambahan dengan komposisi 1/2 konsentrasi garam makro dan mikro MS, vitamin B5 (yang dimodifikasi), zat pengatur tumbuh BAP  $1,33 \mu\text{M}$ , dan sukrosa  $40 \text{ g L}^{-1}$ . Perkecambahan embrio somatik dilakukan di ruangan terang. Penyinaran lampu dilakukan selama 16 jam dengan intensitas penyinaran 1000 - 1500 lux, pada suhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dengan kelembaban relatif  $\pm 60\%$ . Perlakuan yang digunakan adalah media dengan pemberian; a). sukrosa  $40 \text{ g L}^{-1}$  + phytigel  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ , b) sukrosa  $40 \text{ g L}^{-1}$  + phytigel  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  (semi padat), c) gula pasir  $40 \text{ g L}^{-1}$  + phytigel  $2,5 \text{ g L}^{-1}$ , dan d) gula pasir  $40 \text{ g L}^{-1}$  + agar-agar komersial  $9,0 \text{ g L}^{-1}$ .

Perlakuan diulang 10 kali, setiap ulangan terdiri atas satu botol yang berisi sepuluh embrio somatik fase torpedo, sehingga untuk masing-masing perlakuan dikulturkan sebanyak 100 embrio somatik. Embrio yang telah berkecambah disubkultur ke media yang sama. Perlakuan diulang sebanyak 20 kali. Satu botol terdiri dari satu kecambah.

Data yang diperoleh diuji secara statistik menggunakan rancangan acak lengkap. Jika terdapat perbedaan yang nyata akan dilakukan uji lanjut uji jarak dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%. Peubah yang diamati adalah jumlah torpedo, jumlah kecambah, jumlah planlet, tinggi planlet, jumlah daun, jumlah buku, jumlah akar dan panjang akar.

## 3. Respon Embrio Somatik terhadap Penggunaan Gula Pasir dalam Temporary Immersion System

Embrio somatik dari kopi Arabika fase torpedo disubkultur ke alat *Temporary Immersion System* RITA<sup>®</sup>. Media perkecambahan yang digunakan adalah media MS dengan vitamin B5 (yg dimodifikasi), serta zat pengatur tumbuh BAP  $1,33 \mu\text{M}$ . Perlakuan yang digunakan adalah penambahan sukrosa atau gula pasir sebanyak  $40 \text{ g L}^{-1}$ . Sebanyak 150 ml media dituangkan ke RITA<sup>®</sup>. Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit dengan tekanan 1,5 atm.

RITA<sup>®</sup> diprogram untuk memompa media cair setiap 15 menit sekali dengan periode waktu 4 jam. Setiap satu bulan sekali dilakukan subkultur ke media yang sama. Perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Masing-masing ulangan terdiri dari 30 torpedo, sehingga dalam 1 perlakuan ada 90 embrio fase torpedo. Perkecambahan embrio dilakukan dalam penyinaran selama 16 jam dengan intensitas penyinaran 1000 - 1500 luks pada suhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  dengan kelembaban relatif  $\pm 60\%$ .

Data yang diperoleh di analisis statistik menggunakan T test. Peubah yang diamati adalah jumlah planlet, tinggi planlet, jumlah daun, jumlah buku, jumlah akar dan panjang akar.

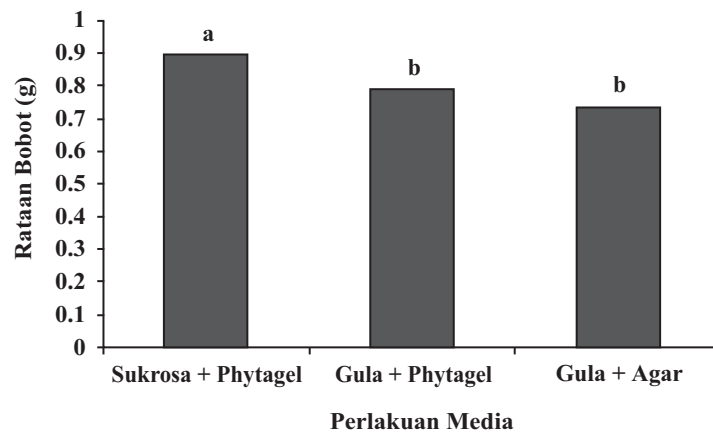
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Respon Kalus Embriogenik terhadap Penggunaan Gula Pasir dan Agar-Agar Komersial

Pemberian gula pasir  $35 \text{ g L}^{-1}$  pada media regenerasi selama tiga bulan memberikan pengaruh terhadap berat kalus dalam proses regenerasi kalus embriogenik kopi Arabika. Hasil analisis statistik menunjukkan bobot kalus menurun secara nyata ketika media diberi perlakuan gula pasir  $35 \text{ g L}^{-1}$ , baik yang dikombinasikan dengan phytigel  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  maupun dengan agar komersial  $9,0 \text{ g L}^{-1}$ . Berat terendah  $0,74 \text{ g}$  terdapat pada perlakuan gula pasir  $35 \text{ g L}^{-1}$  + agar-agar komersial  $9,0 \text{ g L}^{-1}$  (Gambar 1). Penekanan terhadap penambahan bobot basah kalus kemungkinan besar karena adanya cemaran logam yang terdapat di dalam gula pasir yang berdampak buruk terhadap pertumbuhan dan perkembangan kalus kopi Arabika.

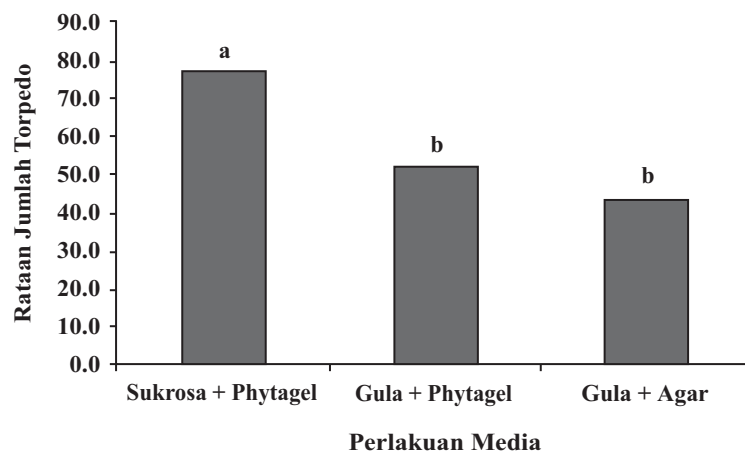
Enam bulan di dalam media regenerasi, embrio samatik fase globular telah tumbuh dan berkembang menjadi fase torpedo. Sejalan dengan pertambahan berat kalus, jumlah embrio somatik fase torpedo yang dihasilkan juga berbeda nyata ketika media diberi perlakuan gula pasir yang dikombinasikan dengan phytigel atau agar-agar komersial (Gambar 2). Jumlah torpedo terendah sebanyak 43,40 terdapat pada perlakuan gula pasir  $35 \text{ g L}^{-1}$  + agar-agar komersial  $9,0 \text{ g L}^{-1}$ . Penurunan ini menunjukkan bahwa pemberian sukrosa  $35 \text{ g L}^{-1}$  dan phytigel  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  belum dapat digantikan oleh penggunaan gula pasir  $35 \text{ g L}^{-1}$  dan agar-agar komersial  $9,0 \text{ g L}^{-1}$ .

Penurunan jumlah torpedo yang dihasilkan dalam penelitian kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan tingkat kemurnian antara gula pasir dan sukrosa. Kadar sukrosa murni dalam sukrosa yang digunakan dalam penelitian ini tingkat kemurniannya  $> 99,5\%$  (Sigma-Aldrich 2017). Selain berbeda tingkat kemurniannya, gula pasir dilaporkan juga mengandung beberapa bahan kimia seperti belerang dioksida dan cemaran logam berat seperti timbal (pb) sebanyak  $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ , tembaga (Cu)  $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ , dan Arsen (As)  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  (Badan Standarisasi Nasional 2010). Kadar sukrosa dari gula pasir yang lebih rendah dari sukrosa murni mengakibatkan adanya perbedaan respon pertumbuhan dan perkembangan kalus embriogenik dalam membentuk embrio fase globular dan torpedo.



Gambar 1. Rataan bobot basah kalus kopi Arabika dalam media regenerasi tiga bulan setelah kultur. Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Figure 1. Mean of fresh-weight calli in regeneration media at three months after culture. Numbers followed by the same letters are not significantly different in Duncan Test ( $\alpha = 0,05$ ).



Gambar 2. Rataan jumlah torpedo kopi Arabika dalam media regenerasi enam bulan setelah kultur. Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Figure 2. Mean of torpedo numbers at six months after culture on medium regeneration. Numbers followed by the same letters are not significantly different in DuncanTest ( $\alpha = 0,05$ ).

Belerang dioksida dan cemaran logam berat yang masih diperbolehkan dalam kandungan gula pasir ternyata memberikan dampak buruk terhadap daya regenerasi kopi Arabika. Kemungkinan terbesar dari dampak yang ditimbulkan adalah dalam proses akumulasi pati dalam sel-sel kalus. Akumulasi pati dalam sitoplasma sel merupakan hal yang diperlukan untuk terjadinya morfogenesis pembentukan kalus dan regenerasinya. Pati berasal dari sukrosa yang ditambahkan ke medium kultur bertindak sebagai sumber energi cadangan sel yang sangat dibutuhkan dalam proses morfogenesis dan biosintesis sel (George et al. 2008; Martins et al. 2015).

## 2. Respon Embrio Somatik terhadap Penggunaan Gula Pasir dan Agar-Agar Komersial pada Media Perkecambahan

Embrio somatik fase torpedo mulai berkecambah pada umur 2 bulan setelah di kulturkan dalam media perkecambahan. Pada pengamatan di bulan ke empat, kecambah mulai tumbuh dan berkembang menjadi planlet, tetapi masih dijumpai adanya torpedo yang belum berkecambah (Gambar 3). Jumlah torpedo pada media yang diberi gula pasir dan agar-agar komersial tidak berbeda nyata dengan gula pasir dan phytigel, tetapi jumlah kecambah dan planlet justru lebih tinggi pada perlakuan sukrosa dan phytigel (padat dan media semi padat).

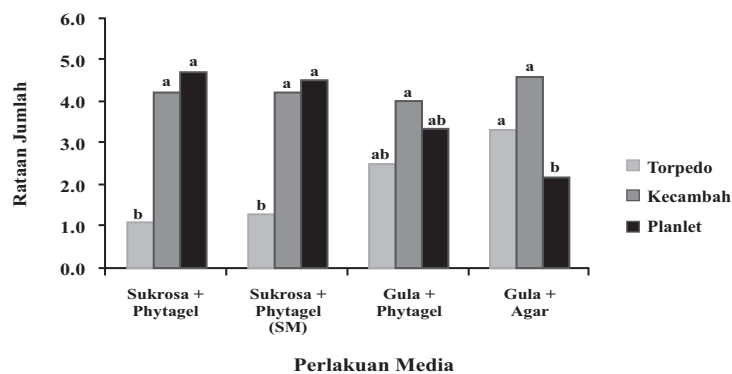
Perbedaan ini diduga karena ketika pembentukan embrio globular dan torpedo, sel-sel sangat membutuhkan glukosa lebih tinggi dibandingkan pada fase perkecambahan. Disamping peran sukrosa yang lebih baik dibandingkan gula pasir, penambahan phytigel pada media regenerasi membantu pertumbuhan dan perkembangan embrio somatik. Hal ini karena phytigel juga mengandung glukosa (Sigma-Aldrich 2017b).

Berbeda dengan fase globular dan torpedo, saat perkecambahan dan pembentukan planlet, sel membutuhkan lebih banyak protein. Protein yang terdapat dalam phytigel lebih tinggi dibandingkan agar komersial. Perbedaan ini sangat berpengaruh terhadap proses perkecambahan dan pembentukan planlet kopi. Hal ini menyebabkan penambahan phytigel di media perkecambahan memperlihatkan pengaruh yang nyata terhadap jumlah planlet.

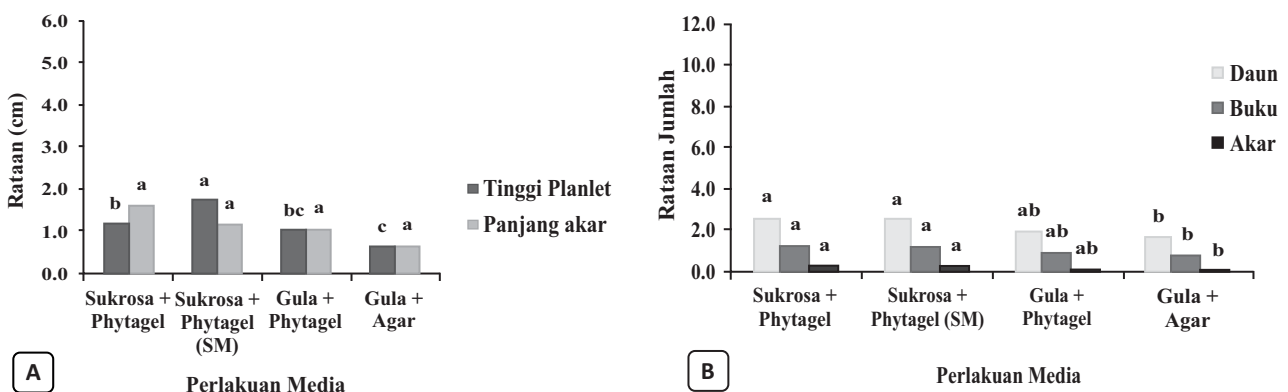
Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa jumlah torpedo, jumlah kecambah dan planlet tidak berbeda nyata

antara media yang menggunakan sukrosa dengan gula pasir yang diaplikasikan pada phytigel, akan tetapi berbeda nyata dengan gula pasir yang diaplikasikan dengan agar-agar komersial. Ini menunjukkan bahwa dalam proses perkecambahan kopi Arabika, penggunaan gula pasir 40 g L<sup>-1</sup> dapat menggantikan sukrosa 40 g L<sup>-1</sup>, tetapi penggunaan gula pasir 40 g L<sup>-1</sup> dan agar-agar komersial 9,0 g L<sup>-1</sup> dapat menekan perkembangan embrio somatik. Ini terlihat dari perkembangan torpedo menjadi kecambah dan planlet yang menurun secara nyata ketika diberikan gula pasir dan agar-agar komersial (Gambar 3).

Hasil analisis statistik pada peubah jumlah daun, buku, dan akar menurun secara nyata pada perlakuan gula pasir dan agar komersial empat bulan setelah kultur. Pada peubah tinggi tanaman, pengurangan dosis phytigel (1,5 g L<sup>-1</sup>) membuat media menjadi semi padat. Hal ini ternyata dapat mempercepat tinggi tanaman, tetapi tidak berpengaruh nyata pada panjang akar (Gambar 4A dan 4B).



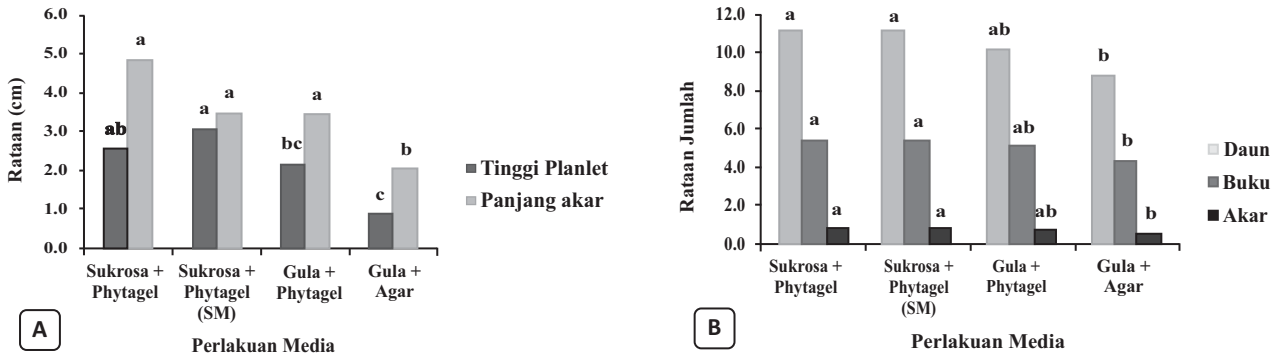
Gambar 3. Rataan jumlah torpedo, kecambah dan planlet kopi Arabika empat bulan setelah kultur  
 Figure 3. Mean of torpedo numbers, seedling and planlet of Arabica coffee four months after culture



Gambar 4. Rataan karakter agronomi (A). Tinggi dan panjang akar planlet (cm), (B). Jumlah daun, buku, dan akar planlet kopi Arabika empat bulan setelah kultur.

Figure 4. Mean of agronomic characters (A). Height and root length of the plantlets (cm), (B). The number of leaves, nodes, and the roots of Arabica coffee plantlets four months after culture.





Gambar 5. Rataan karakter agronomi (A). Tinggi dan panjang akar planlet kopi Arabika 6 bulan setelah kultur. (B). Jumlah daun, buku, dan akar planlet kopi Arabika 6 bulan setelah kultur.

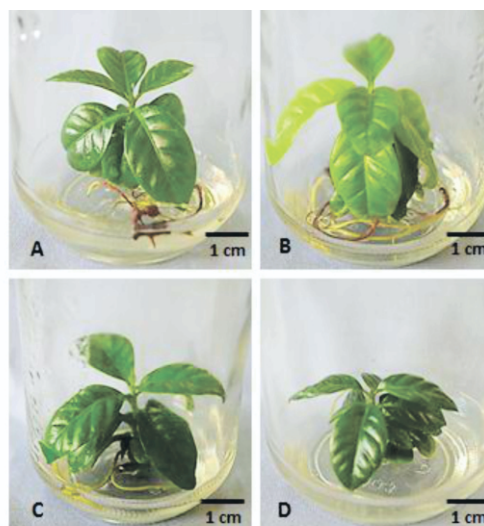
Figure 5. Mean of agronomic characters (A). Height and root length of the plantlets (cm), (B). The number of leaves, nodes, and the roots of Arabica coffee plantlets 6 months after culture

Kecambah yang dihasilkan setelah 4 bulan, kemudian di subkultur ke media yang sama. Masing-masing kecambah ditanam di dalam satu botol. Sejalan dengan pengamatan di bulan ke empat, pada saat enam bulan setelah kultur tinggi tanaman yang tertinggi juga diperoleh pada perlakuan semi padat dan terendah pada perlakuan gula pasir dan agar-agar komersial.

Jumlah daun, jumlah buku, jumlah akar dan panjang akar tertinggi diperoleh pada perlakuan sukrosa dan phytigel, sedangkan hasil terendah pada perlakuan gula pasir dan agar-agar komersial (Gambar 5A dan 5B). Analisis statistik menunjukkan bahwa selain tinggi planlet pada perlakuan sukrosa (40 g L<sup>-1</sup>) + phytigel (1,5 g L<sup>-1</sup>), tidak ada perbedaan yang nyata untuk semua karakter agronomi antara sukrosa (40 g L<sup>-1</sup>) + phytigel (2,5 atau 1,5

g L<sup>-1</sup>) dengan gula pasir (40 g L<sup>-1</sup>) + phytigel (2,5 g L<sup>-1</sup>) yang diamati pada enam bulan setelah kultur. Hasil ini menunjukkan bahwa gula pasir yang dipadatkan dengan phytigel dapat digunakan untuk media pertumbuhan planlet kopi Arabika.

Penggunaan gula pasir juga telah digunakan pada tanaman *Pogostemon cablin* Benth (Swamy et al. 2010), *Zingiber officinale* Rosc (Hapsari et al. 2011), *Manihot esculenta* Crantz (Ogero et al. 2012), *Stevia rebaudiana* (Sharma et al. 2013) dan *Tylophora indica* (Burm f.) Merrill (Rajavel and Stephan 2014). Hasil penelitian tersebut diatas juga mendapatkan hasil yang sama baik, dimana tidak ada perbedaan yang nyata antara media tumbuh yang diberi sukrosa dengan gula pasir.



Gambar 6. Keragaan planlet kopi Arabika enam bulan setelah perlakuan. A. Sukrosa dan phytigel. B. Sukrosa dan phytigel (semi padat). C. Gula pasir dan phytigel. D. Gula pasir dan agar-agar komersial.

Figure 6. Performance of Arabica coffee plantlets at six months after treatment. A. Sucrose and phytigel. B. Sucrose and phytigel (semi-solid). C. Sugar and phytigel. D. Sugar and commercial agar.

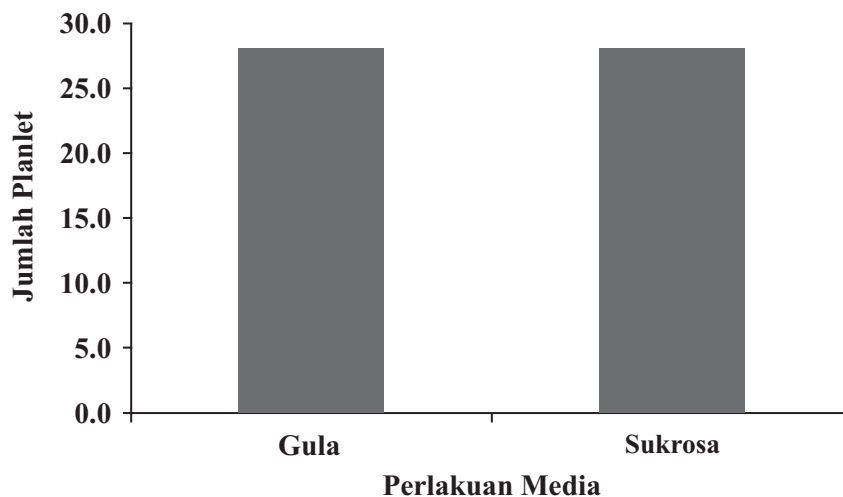
Pemberian agar-agar komersial seperti swallow yang diberikan bersamaan dengan gula pasir dalam media kultur jaringan kopi secara statistik belum mampu menggantikan phytigel. Perbedaan tingkat kemurnian agar kemungkinan besar merupakan faktor penghambat dalam pertumbuhan kultur. Perbedaan tingkat kemurnian terlihat dari tingkat transparansi media. Media yang dipadatkan dengan phytigel terlihat lebih transparan dibandingkan dengan agar-agar komersial. Semakin tinggi kemurnian agar yang digunakan, semakin sedikit jumlah agar yang dibutuhkan dalam membuat media (Priadi et al. 2008). Dalam penelitian ini agar-agar komersial yang dibutuhkan sebanyak 9,0 g L<sup>-1</sup>, sementara phytigel hanya 2,5 g L<sup>-1</sup>. Perbedaan respon tumbuh agar tidak hanya terlihat antara agar-agar komersial dan phytigel saja, juga ditemui antara agar (Sigma-Aldrich), bacto agar (Sigma-Aldrich), gelatin (Gelrite), phytigel (Sigma-Aldrich), potato dextrose agar, corn starch, dan oatmeal agar ketika diaplikasikan pada tanaman *Syngonium podophyllum* L. (Da Silva 2015).

Terjadinya penurunan dalam karakter agronomi yang dihasilkan selain dikarenakan oleh tingkat kemurnian agar yang digunakan, juga disebabkan oleh adanya penambahan vanili untuk pengharum dan pewarna buatan pada agar komersial. Adanya vanili yang merupakan produk metabolisme sekunder dan pewarna buatan tersebut berdampak negatif pada pertumbuhan kultur. Sementara itu, produk phytigel hasil Typical ICP Analysis (%) dilaporkan mengandung unsur Ca sebanyak 0,85, Mg 0,35, kalium 1,70, pospor 0,15, dan Natrium 0,45 (Sigma-Aldrich 2017b). Adanya senyawa-senyawa yang merupakan unsur makro dalam kultur *in vitro* tersebut ternyata dapat mendukung pertumbuhan kultur tanaman kopi Arabika.

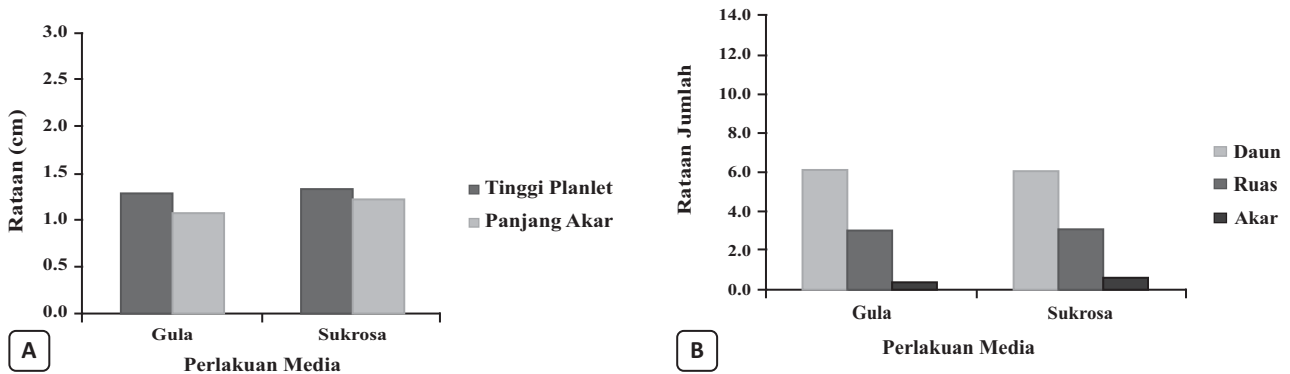
Planlet yang dihasilkan pada media semi padat terlihat sedikit lebih besar dengan warna daun yang lebih muda dibandingkan dengan media padat. Ciri semacam ini biasanya menunjukkan adanya gejala vitrifikasi pada planlet yang dihasilkan. Vitrifikasi pada kultur jaringan sering dijumpai pada media cair, akibat kelebihan air dalam sel tanaman. Pada kultur kopi gejala vitrifikasi juga ditemukan pada perlakuan semi padat namun tidak sampai menimbulkan keabnormalan. Keragaan planlet setelah enam bulan di media kultur yang diuji dapat dilihat pada Gambar 6.

### 3. Respon Embrio Somatik terhadap Penggunaan Gula Pasir dalam *Temporary Immersion System*

Embrio somatik fase torpedo yang dikulturkan mulai berkecambah pada saat dua bulan dalam *Temporary Immersion System* (RITA<sup>®</sup>), dan berkembang menjadi planlet di bulan ke tiga. Tiga bulan dalam RITA<sup>®</sup> jumlah planlet yang diperoleh tidak berbeda nyata antara media perkecambahan yang diberi sukrosa maupun gula pasir (Gambar 7). Jumlah planlet yang terbentuk jika dibandingkan dengan penggunaan botol kultur pada kegiatan sebelumnya, terlihat bahwa penggunaan RITA<sup>®</sup> dapat mempercepat pertumbuhan kultur. Jika pada kegiatan sebelumnya jumlah planlet yang dihasilkan pada perlakuan sukrosa dan gula dengan penambahan phytigel pada empat bulan setelah kultur hanya mencapai 50% dari jumlah torpedo yang ditanam, pada percobaan menggunakan RITA<sup>®</sup> jumlah planlet yang ditanam pada saat 3 bulan mencapai 80%. Ini berarti penggunaan RITA<sup>®</sup> dapat mempercepat proses perkecambahan dan pertumbuhan planlet.



Gambar 7. Jumlah planlet yang dihasilkan pada RITA tiga bulan setelah kultur  
 Figure 7. Number of plantlets produced on the RITA three months after culture

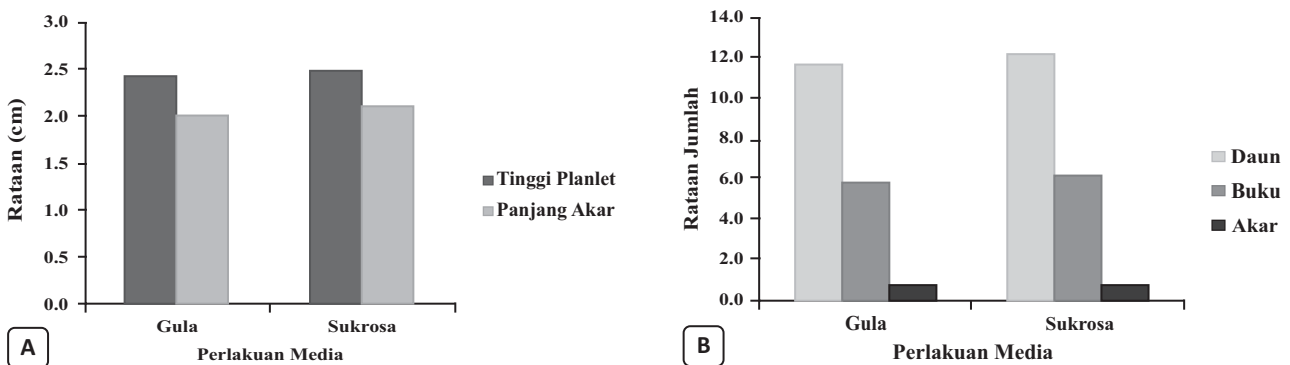


Gambar 8. Keragaan karakter agronomi. A. Tinggi planlet dan panjang akar, B. Jumlah daun, jumlah buku dan jumlah akar planlet kopi Arabika tiga bulan dalam RITA<sup>®</sup>.  
 Figure 8. Performance of agronomic characters. A. High plantlets and root length, B. The number of leaves, number of nodes and the number of roots Arabica coffee plantlets in the RITA<sup>®</sup> three months.

Hasil pengamatan terhadap parameter agronomi tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah buku, jumlah akar, dan panjang akar, pada umur tiga bulan dalam media pendewasaan, menunjukkan bahwa penggunaan sukrosa tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan gula pasir terhadap semua karakter (Gambar 8A dan 8B). Sejalan dengan pengamatan pada bulan ketiga, pada bulan kelima juga memperlihatkan hal yang sama (Gambar 9A dan 9B).

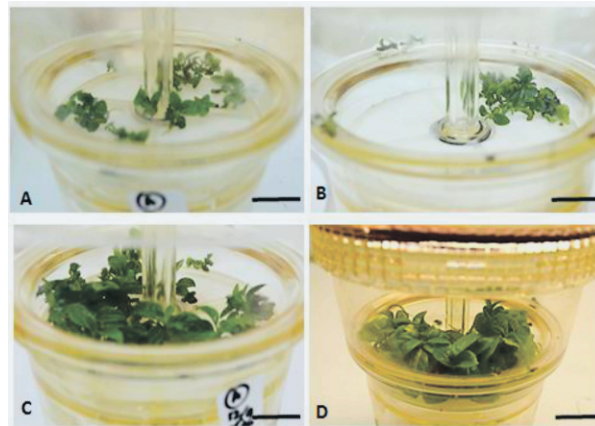
Penggantian sukrosa dengan gula pasir menyebabkan penurunan rata-rata tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah buku, jumlah akar, dan panjang akar namun secara statistik tidak berbeda nyata. Hasil ini mengindikasikan bahwa penggunaan gula pasir komersial dapat digunakan dalam media pendewasaan embrio somatik kopi Arabika dengan menggunakan RITA<sup>®</sup>. Keragaan planlet kopi Arabika dalam RITA<sup>®</sup> ditampilkan pada Gambar 10.

Penggunaan gula pasir pada media menggunakan RITA<sup>®</sup> dalam penelitian ini, memberikan alternatif baru dalam penghematan biaya pembuatan media. Penggunaan RITA<sup>®</sup> juga telah dilaporkan pada perbanyak kopi Arabika (Albarra et al. 2005) dan kopi Robusta (Etienne 2005) melalui embriogenesis somatik. Penggunaan RITA<sup>®</sup> dilaporkan dapat mengurangi gejala vitrifikasi dalam perkembangan embrio somatik kopi yang terjadi ketika menggunakan media cair (Etienne et al. 2006). Penelitian penggunaan RITA<sup>®</sup> juga dilaporkan lebih baik dibandingkan dengan media cair dan media semi padat pada tanaman *Saccharum officinarum* (Yang et al. 2010); *Eucalyptus Sp* (McAlister et al. 2005); *Ananas comosus* (pineapple) (Scheidt et al. 2009).



Gambar 9. Keragaan karakter agronomi. A. Tinggi planlet dan panjang akar. B. Jumlah daun, jumlah buku dan jumlah akar planlet kopi Arabika lima bulan dalam RITA<sup>®</sup>.  
 Figure 9. Performance of agronomic characters. A. High plantlets and root length. B. The number of leaves, number of nodes and the number of roots Arabica coffee plantlets in the RITA<sup>®</sup> five months





Gambar10. Keragaan perkecambahan embriogenesis somatik kopi Arabika memakai RITA®. A. Media dengan sukrosa satu bulan setelah perlakuan. B. Media dengan gula pasir satu bulan setelah perlakuan. C. Media dengan gula pasir tiga bulan. D. Planlet yang berkembang di media dengan gula pasir siap untuk diaklimatisasi.

Figure 10. Performance of germination of somatic embryogenesis wear RITA® Arabica coffee. A. Media with sucrose one month after treatment. B. Media with sugar one month after treatment. C. Media with sugar three months. D. Plantlets growing in media with sugar ready for acclimatized.

#### KESIMPULAN

Penggunaan gula pasir dan agar-agar komersial untuk tujuan efisiensi media kultur pada media regenerasi tidak dapat menggantikan sukrosa dan phytigel, karena dapat menurunkan berat kalus dan jumlah embrio somatik kopi Arabika yang dihasilkan. Pada media perkecambahan penggunaan gula pasir dapat digunakan bila dikombinasikan dengan phytigel, tetapi tidak direkomendasikan dikombinasikan dengan agar-agar komersial, karena dapat menurunkan daya berkecambah. Perkecambahan embrio somatik kopi Arabika menggunakan RITA® dengan media yang diberi gula pasir secara statistik tidak berbeda dengan sukrosa untuk semua parameter yang diamati, sehingga penambahan gula pasir dapat direkomendasikan.

#### TINJAUAN PUSTAKA

- Albarra, J., Bertrand, B., Lartaud, M. & Etienne, H. (2005) Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. [Online] 81, 27–36. Available from: doi:10.1007/s11240-004-2618-8.
- Badan Standarisasi Nasional (2010) *Gula kristal - Bagian 3 : Putih*. SNI 3140.3.2010. hal 1-18
- Cardoso, M.B., Bodanese-zanettini, M.H., de Munstock, E.C. & Kalchuk-Santos, E. (2007) Evaluation of gelling agents on anther culture: Response of two soybean cultivars. *Brazilian Archives of Biology and Tehnology*. 50 (6), 933–939.

- Da Silva, J.A.T. (2015) Response of *Syngonium podophyllum* L. ‘White Butterfly’ shoot cultures to alternative media additives and gelling agents , and flow cytometric analysis of regenerants. *Nusantara Bioscience*. [Online] 7 (1), 26–32. Available from: doi:10.13057/nusbiosci/n070105.
- Etienne, H. (2005) Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: Jain, S.M. & Gupt, P.K. (eds.) *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Springer Netherlands, pp.167–179.
- Etienne, H., Dechamp, E., Barry-Etienne, D. & Bertrand, B. (2006) Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Archives Biology and Technology*. 18 (1), 45–54.
- Gatica-arias, A.M., Arrieta-espinoza, G. & Eaquivel, A.M.E. (2008) Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. *Electric Journal of Biotechnology*. [Online] 11 (1), 1–12. Available from: doi:10.2225/vol11-issue1-fulltext-9.
- George, E.F., Hall, M.A. & Klerk, G.J. De (2008) The Components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. In: *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. [Online] 1, pp.65–113. Available from: doi:10.1007/978-1-4020-5005-3\_3.
- Hapsari, B.W., Ermayanti, T.M., Rantau, D.E. & Rudiyanto (2011) Comparison of the Reduction Effect of sucrose and table sugar concentration on growth characteristics of red ginger (*Zingiber officinale* Rocs.) cultured in liquid medium. *Annales Bogorrienses*. 15 (1), 15–20.

- Ibrahim, M.S.D., Hartati, R.R.S., Rubiyo, Purwito, A. & Sudarsono (2013) Direct and indirect somatic embryogenesis on Arabica coffee (*Coffea arabica*). *Indonesian Journal of Agricultural Science*. 14 (2), 79–86.
- Ibrahim, M.S.D., Hartati, R.R.S., Rubiyo, Purwito, A. & Sudarsono (2015) The Induction of primary and secondary somatic embryogenesis for Arabica coffee propagation. *Journal of Tropical Crop Science*. 2 (3), 6–13.
- Lipavská, H. & Konrádová, H. (2004) Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. [Online] 40 (1), 23–30. Available from: doi:10.1079/IVP2003482.
- Martins, J.P.R., Pasqual, M., Martins, A.D. & Ribeira, S.F. (2015) Effects of salts and sucrose concentrations on in vitro propagation of *Billbergia zebrina*. *Australian Journal of Crop Science*. 9 (1), 85–91.
- McAlister, B., Finnie, J., Watt, M.P. & Blakeway, F. (2005) Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi Forests (SA). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. [Online] 81, 425–442. Available from: doi:10.1007/s11240-006-9094-2.
- Ogero, K.O., Mburugu, G.N., Mwangi, M., Ombori, O. & Ngugi, M. (2012) In vitro micropropagation of cassava through low cost tissue culture. *Asian Journal of Agricultural Sciences*. 4 (3), 205–209.
- Priadi, D., Fitriani, H. & Sudarmonowati, E. (2008) Pertumbuhan in vitro tunas ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) pada berbagai bahan pematat alternatif pengganti agar. *Biodiversitas*. [Online] 9 (1), 9–12. Available from: doi:10.13057/biodiv/d090103.
- Priyono (2010) Evaluation of somatic embryogenesis ability in robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre). *Pelita Perkebunan*. 26 (2), 77–89.
- Rajavel, L. & Stephan, R. (2014) Low cost in vitro propagation of *Tylophora indica* (Burm f.) Merrill. using different carbon sources. *Journal of Academia and Industrial Research*. 3 (5), 221–224.
- Ramage, C.M. & Williams, R.R. (2002) Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 38, 116–124. [Online] 38, 116–124. Available from: doi:10.1079/IVP2002269.
- Rezende, J.C. De, Henrique, C., Carvalho, S. De & Ramia, A.C. (2012) Multiplication of embryogenic calli in *Coffea arabica* L. *Acta Scientiarum*. [Online] 34 (1), 93–98. Available from: doi:10.4025/actasciagron.v34i1.11230.
- Samson, N.P., Campa, C., Gal, L.L., Noiro, M., Thomas, G., Lokeswari, T.S., Kochoko, A.D.E. & Kochko, A. De (2006) Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. [Online] 86, 37–45. Available from: doi:10.1007/s11240-006-9094-2.
- Scheidt, G.N., Arakaki, A.H., Chimilovski, J.S., Portella, A.C.F., Spier, M.R., Woiciechowski, A.L., Biasi, L.A. & Soccol, C.R. (2009) Utilization of the bioreactor of immersion by bubbles at the micropropagation of *Ananas comosus* L. Merrill. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. [Online] 52 (special Number), 37–43. Available from: doi:10.1590/S1516-89132009000700005.
- Sharma, V., Singh, I. & Sharma, S. (2013) Formulation of Medium with Low Cost Option for in vitro Caulogenesis in Ethnomedicinal Herb *Stevia Rebaudiana*. *Trends in Biotechnology Research*. 2 (1), 36–40.
- Sigma-Aldrich (2017a) *Product information Sucrose (cell culture tested)*. www.Sigmaaldrich.com
- Sigma-aldrich (2017b) *Product Information Phytigel*. www.Sigmaaldrich.com
- Swamy, M.K., Sudipta, K.M., Balasubramanya, S. & Anuradha, M. (2010) Effect of different carbon sources on in vitro morphogenetic response of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth). *Journal of phytology*. 2 (8), 11–17.
- Yang, L., Zambrano, Y., Hu, C.J., Carmona, E.R., Bernal, A., Pérez, A., Zayas, C.M., Li, Y.R., Guerra, A., Santana, I. & Arencibia, A.D. (2010) Sugarcane metabolites produced in CO<sub>2</sub>-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. [Online] 46 (6), 558–568. Available from: doi:10.1007/s11627-010-9312-9.