

## INDUKSI EMBRIO SOMATIK SEKUNDER KOPI ARABIKA DAN DETEKSI KERAGAMAN SOMAKLONAL MENGGUNAKAN MARKA SSRs

### *Induction of Secondary Somatic Embryos of Arabica Coffee and Detection Somaclonal Variation Using SSRs Marker*

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

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

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

<sup>3)</sup> Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Tanaman  
Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111

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

e-mail: meynartisaya@yahoo.com

Diterima: 16-01-2017; Direvisi: 02-10-2017; Disetujui: 07-11-2017

#### ABSTRAK

Embriogenesis somatik sekunder pada tanaman kopi dapat digunakan untuk memperbanyak varietas unggul, hasil transformasi dan mutasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan komposisi media terbaik dalam menginduksi embrio somatik sekunder dalam media padat maupun semi padat, dan mengevaluasi kemungkinan terjadinya variasi somaklonal pada planlet yang dihasilkan. Eksplan yang digunakan adalah embrio somatik primer fase torpedo dari varietas AS2K. Perlakuan yang diuji adalah jenis sitokinin yaitu: 2-iP (4,54 dan 9,08  $\mu\text{M}$ ), kinetin (9,30  $\mu\text{M}$ ) dan BAP (BAP 17,76  $\mu\text{M}$  dan 1,33  $\mu\text{M}$ ) dan kepadatan media (padat dan semi padat). Analisis molekuler menggunakan 20 primer marka SSRs dengan jumlah ulangan 10 planlet per perlakuan. Hasil penelitian memperlihatkan media dengan penambahan BAP 17,76  $\mu\text{M}$  menghasilkan persentase embrio somatik sekunder tertinggi (75,50%), embrio somatik sekunder terbanyak (10,63), embrio somatik tersier, kuartar dan kuiner. Jumlah embrio somatik sekunder yang dihasilkan pada media padat lebih banyak dibandingkan semi padat. Berdasarkan analisis molekuler, planlet yang dikulturkan pada semua perlakuan relatif seragam, kecuali pada perlakuan BAP 17,76  $\mu\text{M}$  yang menunjukkan telah terjadi perubahan satu alel pada lokus *ssrR209*. Temuan ini memperlihatkan bahwa penggunaan media kultur dengan 2-iP 9,08  $\mu\text{M}$  lebih dianjurkan untuk menginduksi embrio somatik sekunder karena dapat menghasilkan jumlah embrio somatik cukup banyak dan tidak memperlihatkan adanya variasi somaklonal pada planlet yang dihasilkan.

Kata kunci: *Coffea arabica*, embrio somatik tersier, embrio somatik kuartar, embrio somatik kuiner, media semi-padat

#### ABSTRACT

The secondary somatic embryogenesis of coffee plant can be used to propagate superior varieties, plant resulted from genetic transformation and mutation. Present study aimed to obtain the best media composition for induction of secondary somatic embryos in solid or semi-solid media, and to evaluate the possibility of somaclonal variations occurrence in the resulting plantlets. Primary somatic embryos torpedo phase of the AS2K variety were used as explant sources. Types of cytokines i.e. 2-iP (4.54 and 9.08  $\mu\text{M}$ ), kinetin (9.30  $\mu\text{M}$ ) and BAP (BAP 17.76 and 1.33  $\mu\text{M}$ ) and

medium density (solids and semi-solid) were used as treatments. A total of 20 SSRs marker were used in molecular analysis of plantlets with 10 replication per treatment. The results showed that the media with the addition of BAP 17.76  $\mu\text{M}$  resulted in the highest percentage (75.50%), the highest number of secondary somatic embryos (10.63), the tertiary, quarter and quiner somatic embryos. Number of secondary somatic embryos produced in a dense media was higher than those in the semi-solid media.. Based on molecular analysis, plantlets on all treatment were relatively homogenous except on medium with 17.76  $\mu\text{M}$  BAP which indicated by one allele changing at *ssrR209* locus. These findings indicated that the use of culture medium with supplemented with 9.08  $\mu\text{M}$  2-iP is advisable to induce the secondary somatic embryos due to its capacity to produce high number of somatic embryos and exhibited no somaclonal variations occurred among the plantlets.

Keywords: *Coffea arabica*, tertiary somatic embryos, quarter somatic embryos, quiner somatic embryos, semi solid media

#### PENDAHULUAN

Perbanyakan tanaman kopi Arabika dapat dilakukan secara konvensional menggunakan biji (generatif), stek atau sambung pucuk (vegetatif), dan non konvensional menggunakan teknik kultur *in vitro* (Ibrahim et al. 2012; Ibrahim et al. 2013b). Penggunaan teknik kultur *in vitro* dalam perbanyakan kopi Arabika dapat dilakukan melalui jalur organogenesis (multiplikasi tunas pucuk, adventif dan aksilar) dan embriogenesis somatik (pembentukan embrio somatik) (Etienne et al. 2011); Ibrahim et al. 2013a; Ahmed et al. 2013). Perbanyakan melalui embriogenesis somatik yang diaplikasikan dengan bioteknologi bukan hanya dapat digunakan untuk perbanyakan, tetapi juga untuk memperbaiki karakter tanaman (Santana-Buzzy et al. 2007), sehingga menjadikan penelitian embriogenesis somatik menjadi penting.

Berdasarkan cara terbentuknya, embriogenesis somatik dapat terjadi secara langsung dan tidak langsung. Embriogenesis somatik langsung adalah embrio yang muncul secara langsung dari sel pre-embriogenik dalam jaringan somatik, sedangkan tidak langsung berasal dari jaringan sel somatik yang dirangsang untuk membentuk kalus terlebih dahulu, kemudian terdiferensiasi menjadi embrio. Embriogenesis somatik langsung maupun tidak langsung pada tanaman kopi telah dilaporkan oleh banyak peneliti diantaranya Santana-Buzzy et al. (2007) dan Ibrahim et al. (2013a).

Selain dari cara terbentuknya, embriogenesis somatik kopi juga dapat dikelompokkan berdasarkan tahapan pembentukannya, yaitu embriogenesis somatik primer dan sekunder (Ibrahim et al. 2015). Embrio somatik primer adalah embrio yang terbentuk dari eksplan awal, sementara pada embrio somatik sekunder, pembentukan embrio somatik berasal dari embrio somatik primer. Sejalan dengan cara terbentuknya, embrio somatik sekunder juga dapat terjadi secara langsung (tanpa pembentukan kalus) dan secara tidak langsung (melalui fase pembentukan kalus).

Pembentukan embrio somatik sekunder berkelanjutan dari embrio somatik primer pada tanaman dapat dimanfaatkan untuk tujuan perbanyakan tanaman klonal dan pemuliaan tanaman (Santana-Buzzy et al. 2007) terutama dengan metode rekayasa genetik (Silva and Menéndez-yuffá 2003). Selain untuk tujuan tersebut beberapa keuntungan menggunakan embrio somatik sekunder adalah: ketersediaan eksplan steril yang dapat langsung digunakan untuk perbanyakan, proses penyediaan eksplan bisa lebih cepat karena tidak perlu menginduksi embrio somatik dari luar, dan dapat digunakan untuk memperbanyak tanaman hasil mutasi maupun hasil transformasi genetik (Ibrahim et al. 2015). Pembentukan embrio somatik sekunder pada penelitian terdahulu telah dikaji untuk berbagai tujuan. Hindaningrum et al. (2014) melaporkan pemanfaatan pembentukan embrio somatik sekunder dalam perbanyakan embrio somatik dari endosperma untuk mendapatkan tanaman triploid, perbanyakan maupun perbaikan genetik tanaman anggur (Maillot et al. 2009), benih sintetik pada kelapa sawit (Inpuay and Te-chato 2012), perbanyakan tanaman herbal *Hovenia dulcis* Thunb (Yang et al. 2013), bunga Krisan (Htay et al. 2013), Ginseng (Kim et al. 2012), dan bunga Krokus (Sivanesan et al. 2016).

Penelitian embrio somatik sekunder yang mengikuti proses embrio somatik primer pada kopi Arabika tidak banyak dilaporkan. Induksi embrio somatik sekunder dengan proliferasi yang tinggi tanpa pengkalusan perlu dikaji untuk mendukung usaha perbanyakan klonal, baik untuk tujuan perbanyakan benih, perbanyakan mutan dan hasil transformasi genetik. Hal ini tidak lain untuk meminimalkan terjadinya variasi somaklonal akibat proses pengkalusan yang lama. Salah satu hasil penelitian yang telah dilaporkan adalah pembentukan embriogenesis sekunder kopi Arabika secara langsung menggunakan thidiazuron (Ibrahim et al. 2015). Mahalnya harga thidiazuron menyebabkan kendala tersendiri dalam menghasilkan embriogenesis somatik sekunder, sehingga dipandang perlu untuk mengkaji penggunaan zat pengatur tumbuh yang lebih murah.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi keberhasilan embriogenesis somatik adalah pemilihan bahan pematat dan konsentrasi yang ditambahkan ke dalam media. Harga bahan pematat yang juga mahal dan belum tersedianya *shaker* (alat penggoyang) yang diperlukan ketika menggunakan media cair di beberapa laboratorium, merupakan salah satu pertimbangan dalam mengurangi konsentrasi bahan pematat dalam media tumbuh. Pada penelitian sebelumnya pengurangan phytagel tidak memberikan pengaruh yang nyata dalam menghasilkan embrio somatik sekunder kopi, sehingga untuk efisiensi media penggunaan media semi solid dapat dilakukan (Ibrahim et al. 2015).

Selain mengkaji penggunaan zat pengatur tumbuh dan kepadatan media, mendeteksi ada tidaknya variasi somaklonal dari metode perbanyakan merupakan hal yang penting untuk dilakukan. Terjadinya variasi somaklonal pada perbanyakan tanaman untuk tujuan perbanyakan benih maupun perbanyakan mutan dan transporman tidak diinginkan. Oleh karena itu, deteksi dini variasi somaklonal menggunakan marka molekular sangat diperlukan untuk memastikan bahwa metode yang digunakan tidak sampai mengakibatkan perubahan genetik. Salah satu marka molekular yang banyak digunakan untuk melihat keragaman genetik kopi adalah *Simple Sequence Repeat* (SSR) (Geleta et al. 2012). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan komposisi media terbaik dalam menginduksi embrio somatik sekunder secara langsung dan mendeteksi dini kemungkinan terjadinya variasi somaklonal dari embrio somatik yang dihasilkan menggunakan marka SSRs.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan Mei 2014 sampai Juli 2015. Penelitian dilakukan di dua laboratorium, yaitu Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Unit Pengembangan Benih Unggul Pertanian dan Biologi Molekular, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Penelitian dibagi atas 2 tahap, yaitu: 1) induksi embrio somatik sekunder *Coffea arabica* L. dan 2) evaluasi keragaman somaklonal menggunakan marka SSRs.

### Induksi Embrio Somatik Sekunder *Coffea arabica* L.

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap faktorial 2 faktor dengan 10 ulangan. Faktor pertama adalah zat pengatur tumbuh yaitu sitokinin yang terdiri dari 5 perlakuan yaitu 2-iP (4,54 atau 9,08  $\mu\text{M}$ ), kinetin (9,30  $\mu\text{M}$ ), BAP (17,76  $\mu\text{M}$  atau 1,33  $\mu\text{M}$ ) yang ditambahkan pada media  $\frac{1}{2}$  MS. Faktor kedua adalah kepadatan media (media padat dan semi padat). Eksplan yang digunakan untuk menginduksi embrio somatik sekunder adalah embrio somatik primer fase torpedo kopi Arabika varietas Andung Sari 2 Komposit (AS2K). Percobaan dilakukan dengan sepuluh ulangan. Satu ulangan terdiri dari 10 embrio fase

torpedo. Peubah yang diamati meliputi: persentase pembentukan embrio somatik sekunder dan jumlah embrio somatik sekunder yang dihasilkan. Pemilihan kinetin 9,30  $\mu\text{M}$  dan BAP 17,76  $\mu\text{M}$  karena merupakan media regenerasi pada penelitian Samson et al. (2006) dan Etienne (2005), sementara BAP 1,33  $\mu\text{M}$  merupakan media perkecambahan untuk embriogenesis somatik hasil penelitian sebelumnya.

Media padat dibuat dengan penambahan phytigel 2,50 gram L-1, sementara media semi cair dengan 1,50 gram L-1. Kultur diinkubasi dalam ruang gelap dengan suhu  $\pm 25^\circ\text{C}$  sampai terbentuk embrio somatik sekunder. Eksplan yang membentuk embrio somatik sekunder fase kotiledonari disubkultur ke media pendewasaan. Media pendewasaan merupakan media MS tanpa zat pengatur tumbuh. Kultur diinkubasi dalam kondisi terang pada  $\pm 25^\circ\text{C}$  dengan intensitas penyinaran 1000 - 1500 luks dan kelembaban relatif  $\pm 60\%$ . Planlet yang terbentuk kemudian diaklimatisasi di rumah kaca.

### Analisis Data

Analisis statistik menggunakan *Statistical Analysis System* (SAS). Jika hasilnya menunjukkan perbedaan yang nyata maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji jarak dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5%.

### Evaluasi Keragaman Somaklonal Menggunakan Marka SSR

Daun dari sepuluh planlet yang berasal dari masing-masing perlakuan kopi Arabika varietas AS2K hasil embrio somatik sekunder ditimbang  $\pm 2$  g, kemudian diekstraksi menggunakan metode *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB) mengacu pada hasil penelitian Orozco-Castillo et al. (1994) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 700  $\mu\text{l}$  larutan bufer ekstraksi beserta 2-mercaptoethanol 0,1% dan PVP 1% ditambahkan ke dalam hasil gerusan, dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu  $65^\circ\text{C}$ . Selanjutnya ditambahkan sebanyak 500  $\mu\text{l}$  kloroform dan isoamil alkohol (24:1v/v), dicampur sampai homogen dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan (larutan sebelah atas) dipindahkan ke tabung mikro baru dan ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 500  $\mu\text{l}$ , diikuti dengan penambahan sodium asetat 3M (pH 5,2) sebanyak 50  $\mu\text{l}$ . Sampel disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit. Pelet DNA dicuci dengan ethanol 70% sebanyak 300  $\mu\text{L}$ , disentrifugasi 13.000 rpm selama 5 menit, kemudian cairan dalam tabung dibuang.

Tabel 1. Daftar primer SSR yang digunakan dalam mendeteksi variasi somaklonal kopi Arabika  
Table 1. List of SSR primer used for detected somaclonal variations of Arabica coffee

No	Primer / Primary	Sekuen / Sequences	Motif pengulangan / Motive of repetition
1	M428 <sup>a</sup>	F-GGGCACCAAAAGAAAGTGG R-GATGTGAAATGCAAGCAGGA	(AC)9
2	M329 <sup>a</sup>	F-ACTCAGACAAACCTTCAAC R-GATGTTTTGCATCTATTGG	(GT)10
3	M363 <sup>a</sup>	F-GCATCTTCGTCCTTTGG R-GAAACGGGGCACTTGA	(AT6)(AC7)
4	M358 <sup>a</sup>	F-CATGCACTATTATGTTGTTTT R-TCTCGTCATATTTACAGGTAGGTT	(CA)11
5	M312 <sup>a</sup>	F-TTGCGTAAAGAGAACGAGCA R-GTGTGGAAAATTCACCTGAGC	(TG)9
6	M840 <sup>a</sup>	F-GTCAGAGGCAACTGTAGGTTAATG R-CCAAATCCACTATTTCTTGGTTG	(AC)19
7	CS <sup>b</sup>	F-GCCGAATGCTCCTTACTTTC R-CAGGATACAGGGGAATGGGATC	EST
8	ICL <sup>b</sup>	F-GGCACAGCATCAAGAACCT R-ATCCAGTATCGCCATCAGC	EST
9	ETR <sup>b</sup>	F-GAGATGGTCCCTGCATGTTA R-TTGCTCGTCTTGAACCATAGC	EST
10	GAL <sup>b</sup>	F-CAGGAACCCAGGATTACA R-AGTTCTGCCAACAGTCA	EST
11	ssrR105 <sup>c</sup>	F-CACCAATCCACTGACAATG R-TCCCTGCCAACACACTTC	GA(18)
12	ssrR209 <sup>c</sup>	F-CGGGGGTAAAAAGATTGTAA R-TTGGTGGGAGGGGAGTA	GA(16)
13	ssrR268 <sup>c</sup>	F-GTATCCACAATGAAATCAC R-AGTAGAATTTTCAACATATAAG	GA(19)
14	SSR119699 <sup>c</sup>	F-GCCGTGGTGGAAGATGACT R-CGAGTTCACCAAGAACGTCA	AT(5)
15	SSR123557 <sup>c</sup>	F-ATCTCCTCGTCTTCCCCAT R-GCTTGTAGCAGGAGGAAAC	CT(4)
16	ssrR175 <sup>c</sup>	F-GCAGTGACGCAGCAATG R-AAAAGGAGAGCCAAAGCAGT	GA(20)
17	ssrA8847 <sup>c</sup>	F-GCACACATGAAAAAGATGCT R-GATGGACAGGAGTTGATGG	GT(18)GA(18)
18	ssrCMA008 <sup>c</sup>	F-CATTCTGGTCTGATGCTCT R-TCATTCACTTATTAACGTCCATC	(CT)14(TG)10
19	ssrCMA059 <sup>c</sup>	F-GATGGACAGGAGTTGATGGT R-TTTTAACTCATTTTGCCAAT	(CT9)CA8
20	ssrCMA198 <sup>c</sup>	F-AGCAACTCCAGTCTCAGGT R-TGGAAGCCCGCATATAGTTT	(TG)9(AG)18

Keterangan: Referensi primer yang digunakan <sup>a</sup>(Priyono and Sumirat 2012), <sup>b</sup>(Gaspari-Pezzopane et al. 2012) dan <sup>c</sup>(Teressa et al. 2010)

Pelet DNA dikeringkan menggunakan oven 50°C selama 10 - 15 menit atau dibiarkan selama 12 jam, kemudian ditambahkan larutan buffer TE 50 µL. Setelah kualitas dan kuantitas ditentukan, DNA dianalisis dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan mesin Bio-Rad (*T 100- Thermal Cycler*). Program amplifikasi dimulai dengan pre-denaturasi pada suhu 94°C selama 4 menit, dilakukan pengulangan 35 siklus yang terdiri dari tahapan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55°C selama 1 menit, pemanjangan primer (*elongation*) pada suhu 72° C selama 2 menit, dan diakhiri dengan 1 siklus reaksi pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 7 menit. Komposisi bahan untuk reaksi PCR terdiri atas H<sub>2</sub>O, enzim taq polimerisasi, satu set primer SSR (*forward* dan *reverse*), dan DNA cetakan. Daftar primer SSRs yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil amplifikasi DNA kopi dielektroforesis menggunakan gel poliakrilamid 8%. Tegangan listrik atau voltase yang digunakan selama proses elektroforesis adalah 90 volt selama 90 menit. Gel diwarnai dengan merendamnya dalam larutan etidium bromida. Selanjutnya pola pita hasil amplifikasi diamati di bawah sinar UV dengan perangkat *Chemidoc gel system* (Biorad).

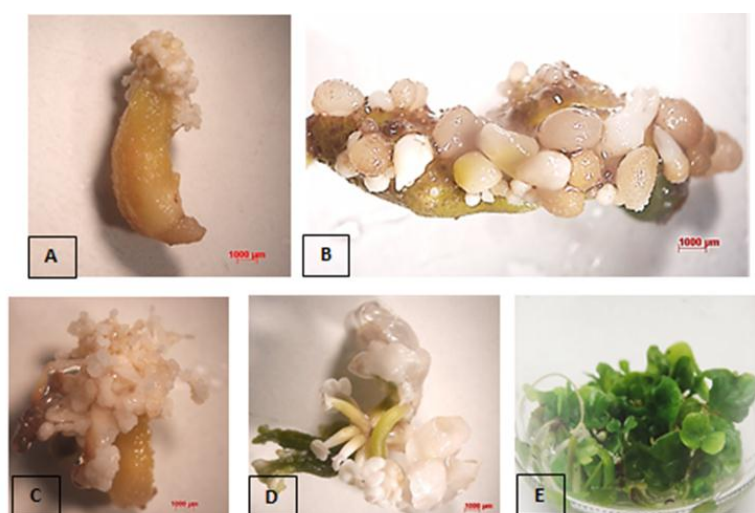
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi Embrio Somatik Sekunder *Coffea arabica* L.

Pembentukan embrio somatik sekunder dari embrio somatik primer mulai terjadi 4 minggu setelah eksplan

dikulturkan pada media induksi embrio somatik sekunder. Embrio berbentuk globular mulai terlihat 6 minggu setelah induksi (Gambar 1A), dan pada minggu ke-8 embrio sudah memasuki fase oblong (Gambar 1B). Fase torpedo terlihat pada minggu ke-12 setelah induksi embrio somatik sekunder (Gambar 1C), kemudian berkembang menjadi fase kotiledonari pada minggu ke-16 (Gambar 1D), embrio mulai berkecambah pada minggu ke 20 dan menjadi planlet pada minggu ke-28. Pembentukan embrio somatik sekunder terjadi secara langsung, dan pembentukan embrio terlihat berkembang dari permukaan torpedo (eksplan embrio somatik primer), tidak hanya di bagian bawah eksplan tetapi dapat menyebar ke seluruh permukaan eksplan (Gambar 1B). Pembentukan embrio somatik sekunder secara langsung juga dilaporkan oleh Oktavia et al. (2003) dan Silva et al. (2005) yang melakukan induksi pada media padat dan kultur suspensi. Histologi pada penelitian Silva et al. (2005) memperlihatkan pembentukan embrio somatik sekunder yang dihasilkan pada kultur suspensi terbentuk langsung dari pembelahan sel di epidermal dan subepidermal dari hipokotil embrio somatik primer.

Pengamatan morfologi memperlihatkan bahwa ukuran embrio somatik fase globular, oblong, torpedo dan kecambah yang dihasilkan pada media semi padat ukurannya terlihat lebih besar dibandingkan dengan media padat, namun tidak sampai menjadi abnormal. Hal ini kemungkinan besar karena kandungan air dalam media cair lebih banyak dibandingkan pada media padat sehingga terjadi gejala *hiperhidrisit* (vitrifikasi). Gejala vitrifikasi juga ditemukan pada kultur embrio somatik kakao yang menggunakan media cair (Pancaningtyas 2013).



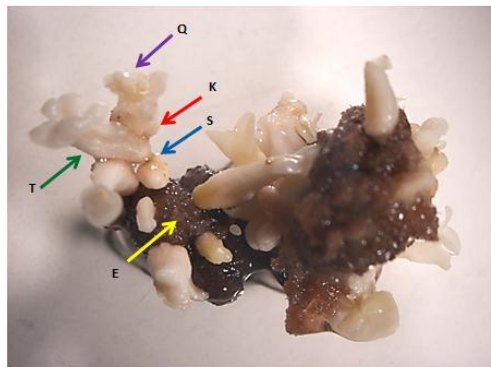
Gambar 1. Perkembangan embrio somatik sekunder kopi Arabika. A. Embrio globular terlihat berkembang dari permukaan eksplan awal (torpedo). B Fase oblong. C. Fase torpedo, D. Fase kotiledonari, E. Kecambah.

Figure 1. Development of secondary somatic embryos of Arabica coffee. A. Globular embryo developed from the surface of the initial explants (torpedo). B Oblong phase. C. Torpedo phase, D. Cotyledonary phase, E. Germinated embryos.



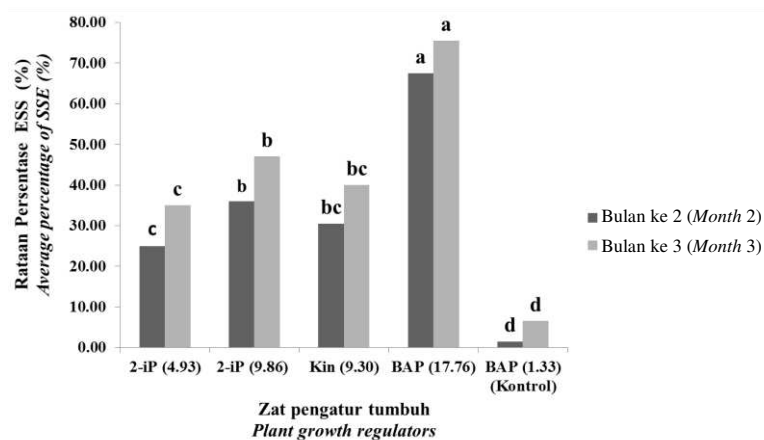
Hasil pengamatan pada perlakuan BAP 17,76  $\mu\text{M}$  terlihat bahwa embrio somatik berkembang tidak hanya sebatas embrio somatik sekunder saja, namun berkembang menjadi tersier, kuartar dan kuiner. Perkembangan embrio sekunder sampai kuiner terlihat terbentuk secara langsung dari eksplan embrio somatik primer sebelumnya (Gambar 2). Hasil seperti ini belum pernah dilaporkan sebelumnya, sehingga merupakan fenomena baru yang perlu diteliti keberadaannya pada embriogenesis somatik kopi. Terjadinya fenomena pembentukan embrio somatik berulang dari embrio somatik primer menjadi embrio somatik sekunder, tersier, kuartar dan kuiner diduga karena kandungan sitokinin dalam media yang cukup tinggi, menyebabkan pembelahan sel menjadi lebih cepat, sehingga terbentuk embrio somatik baru dari embrio somatik yang sudah ada.

Hasil analisis statistik terhadap persentase embrio somatik sekunder menunjukkan tidak ada interaksi antar perlakuan sitokinin dengan kepadatan media, tetapi secara tunggal, masing-masing faktor menunjukkan pengaruh yang nyata antar perlakuan. Media dengan penambahan BAP 17,76  $\mu\text{M}$  menghasilkan persentase pembentukan embriogenesis somatik sekunder tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya, dengan nilai 67,50% pada bulan ke-1 dan 75,50% pada bulan ke-2 (Gambar 3). Sementara itu media padat lebih baik dibandingkan semi padat, baik pada bulan ke-2 maupun bulan ke-3 (Gambar 4). Hasil ini berbeda dari penelitian (Ibrahim et al. 2015) yang menginduksi embrio somatik sekunder menggunakan thidiazuron, yang menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antara media padat dan semi padat. Perbedaan dari kedua penelitian ini diduga disebabkan perbedaan jenis sitokinin yang digunakan.



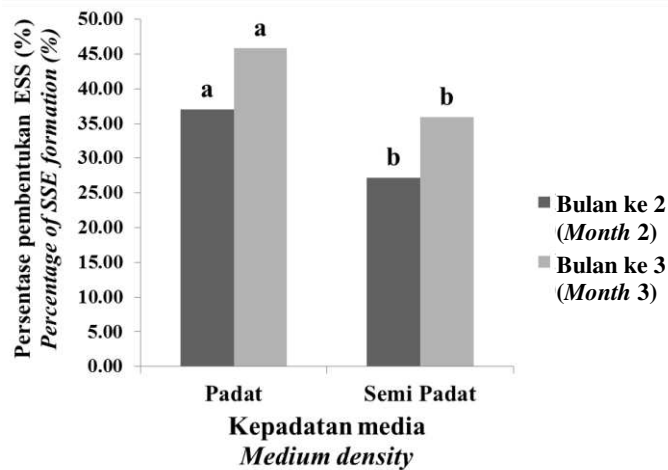
Gambar 2. Keragaan embriogenesis somatik primer kopi Arabika yang berkembang menjadi embrio somatik sekunder, tersier, kuartar dan kuiner. Kerangan: E = Eksplan awal embrio somatik primer (panah kuning), S = Embrio somatik sekunder (panah biru), T = tersier (panah hijau), K = kuartar (panah merah), Q = kuiner (panah ungu).

Figure 2. Performance of primary somatic embryogenesis of Arabica coffee develop into secondary, tertiary, and quiner quarter. Note: E = early explant of the primary somatic embryos (yellow arrow), S = secondary Somatic embryos (blue arrows), T = tertiary (green arrow), K = quarter (red arrows), Q = quiner (purple arrow).



Gambar 3. Rataan persentase pembentukan embrio somatik sekunder (ESS) pada berbagai konsentrasi sitokinin, 2 dan 3 bulan setelah induksi. Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Figure 3. Average percentage of secondary somatic embryo (SSE) on different cytokinin concentration, 2 and 3 months induction. Numbers followed by the same letters are not significantly different at Duncan Test ( $\alpha = 0.05$ )



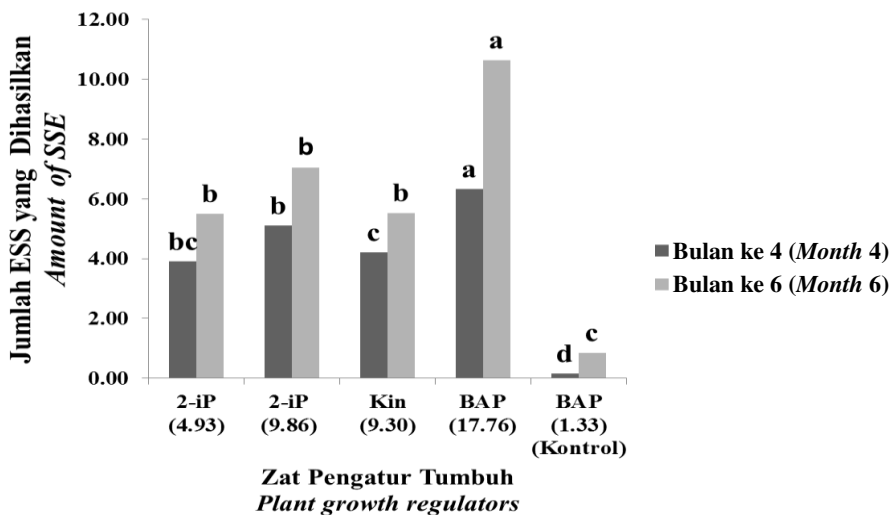
Gambar 4. Rataan persentase embrio somatik sekunder pada media padat dan semi padat, 2 dan 3 bulan setelah induksi. Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Figure 4. Average percentage of secondary somatic embryo on solid and semi-solid media, 2 and 3 months after induction. Numbers followed by the same letters are not significantly different at Duncan Test ( $\alpha = 0.05$ ).

Sejalan dengan persentase pembentukan embrio somatik sekunder, jumlah embrio somatik sekunder terbanyak juga dihasilkan dari media yang diberi BAP 17,76  $\mu\text{M}$  dengan hasil 6,92 pada bulan ke-4, dan 10,63 di bulan ke-6. Hasil terendah diperoleh pada perlakuan BAP 1,33  $\mu\text{M}$ , yang merupakan media pendewasaan dalam proses embriogenesis somatik (Gambar 5). Embrio somatik sekunder yang diperoleh pada media padat lebih banyak dibandingkan semi padat (Gambar 6). Penurunan persentase pembentukan embrio somatik sekunder dan jumlah embrio somatik sekunder pada media semi padat terlihat nyata pada

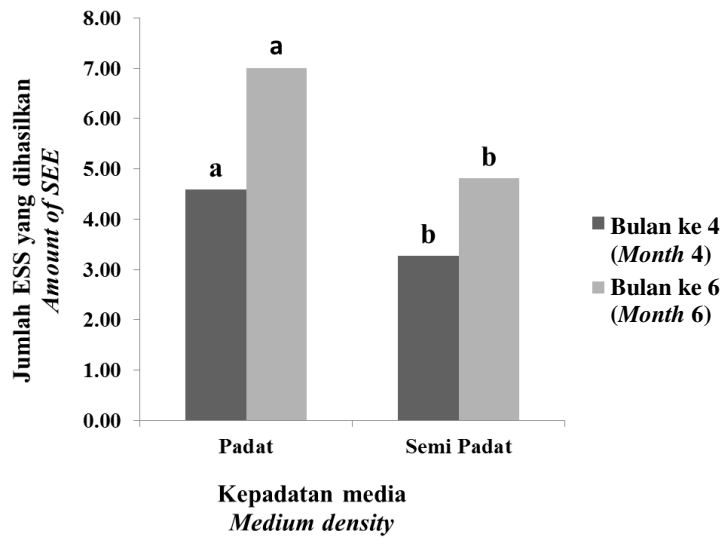
semua perlakuan yang diuji pada 4 dan 6 bulan setelah kultur.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pembentukan embrio somatik sekunder dapat terbentuk pada medium yang hanya menggunakan satu jenis sitokinin. Semakin tinggi konsentrasi sitokinin yang ditambahkan dalam media perlakuan, maka jumlah embrio somatik sekunder yang dihasilkan juga semakin banyak. Penggunaan satu jenis sitokinin (BA) juga dilaporkan pada penelitian (Silva et al. 2005) kopi Arabika Cv. Catimor dan (Ibrahim et al. 2015) dalam pembentukan embrio somatik sekunder kopi Arabika varietas AS2K.



Gambar 5. Rataan jumlah embrio somatik sekunder (ESS) pada berbagai konsentrasi sitokinin, 4 dan 6 bulan setelah induksi. Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Figure 5. Average amount of secondary somatic embryo (ESS) on different cytokinin concentration, 4 and 6 months after induction. Numbers followed by the same letters are not significantly different at Duncan Test ( $\alpha = 0.05$ ).



Gambar 6. Rataan persentase embrio somatik sekunder pada media padat dan semi padat, 4 dan 6 bulan setelah induksi. Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan ( $\alpha = 0,05$ ).

Figure 6. Average percentage of secondary somatic embryo on solid and semi-solid media, 4 and 6 months after induction. Numbers followed by the same letters are not significantly different at Duncan Test ( $\alpha = 0.05$ ).

Hasil rataan embrio per eksplan yang diperoleh pada penelitian ini lebih baik dari penelitian Oktavia et al. (2003) yang menggunakan IAA 0,60  $\mu\text{M}$  dan BAP 22,20  $\mu\text{M}$  dengan hasil 52,60% dan rataan embrio per eksplan 6,25. Pemberian BAP tunggal yang lebih rendah dari BAP 22,20  $\mu\text{M}$  dan tanpa IAA dalam penelitian ini dapat menghemat biaya untuk media tumbuh. Jika dibandingkan dengan penelitian Ibrahim et al. (2015) yang menggunakan thidiazuron, hasil penelitian ini lebih baik karena dapat menghasilkan jumlah embrio somatik sekunder yang lebih banyak. Walaupun konsentrasi BAP yang digunakan lebih tinggi dibandingkan thidiazuron, namun harga thidiazuron yang jauh lebih mahal daripada BAP, menjadikan perlakuan BAP lebih efisien. Selain pada tanaman kopi, penggunaan BAP juga dilaporkan dalam menginduksi embrio somatik *Hovenia dulcis* Thunb (Yang et al. 2013).

### Evaluasi Keragaman Somaklonal Menggunakan Marka SSR

Hasil visualisasi dari sampel DNA memperlihatkan adanya pola pita yang cukup jelas. Pola pita tersebut merupakan hasil perpasangan antara nukleotida primer dengan nukleotida tanaman kopi Arabika varietas AS2K, yang jumlah dan intensitasnya sangat tergantung pada kemampuan primer untuk mengenali urutan DNA komplementernya.

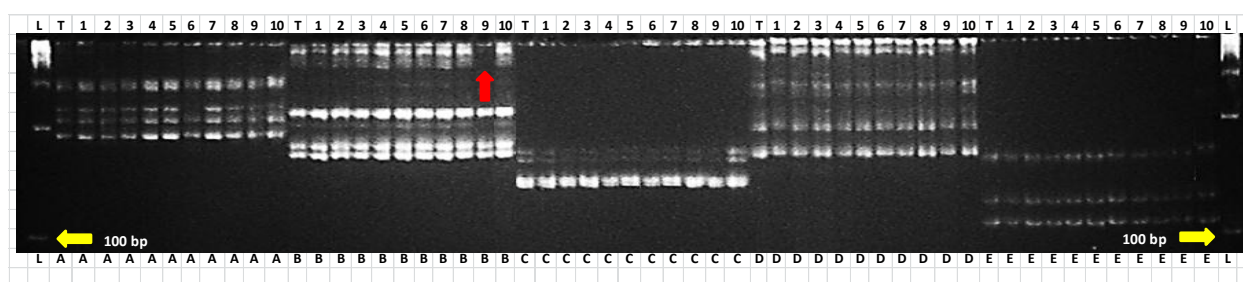
Karakterisasi molekuler dari ke-50 sampel kopi Arabika varietas AS2K dengan penanda SSR menunjukkan tidak terjadi perubahan pola pita pada 19 dari 20 primer yang diuji, baik terhadap sesama perlakuan maupun jika dibandingkan dengan tanaman sumber eksplan (kontrol). Perbedaan satu lokus pita DNA hanya terjadi pada primer *ssrR209* (Gambar 7). Perubahan satu alel dari pola pita

DNA dari planlet kopi Arabika yang berasal dari perlakuan BAP 17,76  $\mu\text{M}$  ini menunjukkan terjadinya variasi somaklonal selama proses pembentukan embrio somatik.

Terjadinya variasi somaklonal pada perlakuan BAP 17,76  $\mu\text{M}$  diduga akibat adanya proses pembentukan embrio somatik yang berulang. Dalam menginduksi embrio somatik sekunder tidak hanya menghasilkan embrio somatik sekunder saja namun juga menghasilkan embrio somatik tertier, kuartier dan kuiner (Gambar 2). Pembentukan embrio somatik berulang ini diduga telah memicu terjadinya perubahan pola pita tersebut, sehingga disarankan untuk tidak menggunakan sitokinin dalam dosis tinggi dalam merangsang terjadinya embrio somatik sekunder. Tingginya dosis sitokinin yang digunakan dapat menyebabkan pembelahan sel berjalan cepat sehingga dapat menghasilkan keragaman somaklonal.

Variasi somaklonal pada penelitian ini hanya 0,1%, masih lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian lain yang menyatakan bahwa frekuensi variasi somaklonal pada kopi bervariasi antara 2% hingga 10% (Gatica-arias et al. 2008). Perbedaan ini disebabkan karena frekuensi terjadinya variasi somaklonal dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya genotipe tanaman, sumber eksplan, umur kultur, jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan, serta level ploidi dan jumlah kromosom tanaman yang digunakan (Etienne and Bertrand 2003).

Adanya variasi somaklonal berpotensi mengakibatkan perubahan fenotipe di lapangan, tergantung seberapa besar peran genetik yang ditimbulkan. Dalam hal ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Untuk menghindari terjadinya variasi somaklonal, perlu proses pemilihan embrio somatik yang tepat sebagai sumber eksplan jika hendak memperbanyak kopi menggunakan embriogenesis somatik.



Gambar 7. Pola pita DNA planlet kopi Arabika varietas AS2K hasil embriogenesis sekunder pada perlakuan BAP 17,76  $\mu$ M menggunakan marka SSR. A. Primer *ssrR105*. B. Primer *ssrR209*. C. Primer *ssrR 268*. D. Primer *SSRA 8847*. E. Primer *ssrCMA008*. Keterangan : L = Lader 100 bp; angka 1-10 = ulangan untuk masing-masing primer; T = Tanaman sumber eksplan per masing-masing primer yang digunakan (kontrol). Tanda panah berwarna merah menunjukkan perubahan satu alel pada sampel. Panah berwarna kuning menunjukkan posisi 100 pasang basa sebagai ukuran terbawah dari DNA ladder

Figure 7. DNA banding patterns of secondary somatic embryogenesis of Arabica coffee varieties AS2K treated by 17,76  $\mu$ M BAP. A. Primer *ssrR105*. B. Primer *ssrCMA059*. C. Primer *ssrCMA008*. D. Primer *ssrA8847*. E. Primer *ssrCMA198*. Note: L = 100 bp DNA Ladder; Number 1-10 = replicates for each primer; T = Plant sources of explant per each of the used primers (control). Red arrow indicated change in one allele in the sample. Yellow arrow indicates the position of 100 base pairs of DNA Ladder as the lowest size

Variasi somaklonal pada kopi dilaporkan semakin tinggi jika masa induksi kalus diperpanjang. Penelitian (Etienne 2005) memperlihatkan variasi somaklonal yang bertambah seiring dengan lamanya kultur suspensi yang dilakukan, terendah 1,3% pada kultur suspensi dengan lama 3 bulan dan meningkat secara nyata mencapai 6, 10, dan 25% masing-masing pada kultur suspensi umur 6, 9 dan 12 bulan.

Untuk menghindari terjadinya variasi somaklonal maka penggunaan BAP 17,76  $\mu$ M tidak dianjurkan dalam menginduksi embrio somatik sekunder kopi Arabika. Perlakuan 2-iP 4,54 dan 9,08  $\mu$ M menunjukkan hasil yang sama baik dengan kinetin 9,30  $\mu$ M dan tidak memperlihatkan adanya variasi somaklonal dari planlet yang dihasilkan. Meskipun demikian, untuk mendapatkan hasil yang maksimal penggunaan 2-iP 9,08  $\mu$ M lebih dianjurkan karena dapat menghasilkan jumlah embrio somatik yang lebih banyak.

### KESIMPULAN

Konsentrasi zat pengatur tumbuh berperan penting dalam proses embriogenesis somatik sekunder. Penambahan BAP 17,76  $\mu$ M menghasilkan persentase tertinggi pembentukan embrio somatik (75,50%) dengan jumlah embrio somatik sekunder terbanyak (10,63/eksplan embrio somatik primer). Jumlah embrio somatik sekunder yang dihasilkan pada media padat lebih banyak dibandingkan semi padat. Pada media dengan penambahan BAP 17,76  $\mu$ M selain embrio somatik sekunder, juga terbentuk embrio somatik tersier, kuarter dan kuiner. Perubahan satu alel pada pola pita di primer *ssrR209* dari satu planlet perlakuan BAP 17,76  $\mu$ M memperlihatkan adanya variasi somaklonal dari planlet hasil embrio somatik

sekunder. Untuk menghindari terjadinya variasi somaklonal, BAP 17,76  $\mu$ M tidak dianjurkan. Penggunaan 2-iP 9,08  $\mu$ M lebih baik karena dapat menghasilkan jumlah embrio somatik cukup banyak dan tidak memperlihatkan adanya variasi somaklonal.

### DAFTAR PUSTAKA

Ahmed, W., Feyissa, Ti. & Tesfaye. Disasa (2013) Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 88 (4), 469–475.

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. & Bertrand, B. (2003) Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiology*. 23 (1), 419–426.

Etienne, H., Bertrand, B., Ribas, A., Lashermes, P., Malo, E., Montagnon, C., Alpizar, E., Bobadilla, R., Simpson, J., Dechamp, E., Jourdan, I. & Georget, F. (2011) *Current Application of coffee (Coffea arabica) somatic Embryogenesis for Industrial Propagation of Elite Heterozygote Material In Central America and Mexico*. In: Park, Y., et al. (eds.) *Proceeding Advances in Somatic embryogenesis of Trees and Its Application for the Future Forests and Plantations*. Suwon, Republic of Korea, IUFRO Working Party 2.09.02, pp.1–157.



- Gaspari-Pezzopane, C. De, Bonturi, N., Filho, O.G., Favarin, J.L. & Maluf, M.P. (2012) Gene expression profile during coffee fruit development and identification of candidate markers for phenological stages. (1), 972–982.
- 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 Catuaí. *Electric Journal of Biotechnology*. [Online] 11 (1), 1–12. Available from: doi:10.2225/vol11-issue1-fulltext-9.
- Geleta, M., Herrera, I., Monz, A. & Bryngelsson, T. (2012) Genetic Diversity of Arabica Coffee (*Coffea arabica* L.) in Nicaragua as Estimated by Simple Sequence Repeat Markers. *The scientific world journal*. [Online] 2012, 1–11. Available from: doi:10.1100/2012/939820.
- Hindaningrum, I.F., Made, N., Wiendi, A. & Widodo, D. (2014) Pembentukan Embrio Endospermik Sekunder Mangga (*Mangifera indica* L.) Gedong Gincu Klon 289 Secondary Endospermic Embryos Formation in Mango (*Mangifera indica* L.) Gedong Gincu Clone 289. 42 (2), 150–157.
- Htay, A., Chang, N. & Kim, K. (2013) Primary and secondary somatic embryogenesis in Chrysanthemum cv. Euro. [Online] 361–368. Available from: doi:10.1007/s11240-012-0243-5.
- Ibrahim, M.S.D., Hartati, R.R.S., Rubiyo, Purwito, A. & Sudarsono (2013a) 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 (2013b) Induksi Kalus Embriogenik dan Daya Regenerasi Kopi Arabika Menggunakan 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid dan 6-Benzyladenine. *Buletin Riset Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri*. 4 (2), 91–98.
- 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.
- Ibrahim, M.S.D., Sudarsono, Syafaruddin & Rubiyo (2012) Pengaruh Komposisi Media Terhadap Pembentukan Kalus Embriogenesis Somatik Kopi Arabika (*Coffea arabica*). *Buletin Riset tanaman Rempah dan Aneka tanaman industri*. 3 (1), 13–22.
- Inpuay, K. & Te-chato, S. (2012) Primary and secondary somatic embryos as tool for the propagation and artificial seed production of oil palm. 8 (2), 597–609.
- Kim, Y., Lee, O.R., Kim, K. & Yang, D. (2012) High Frequency of Plant Regeneration through Cyclic Secondary Somatic Embryogenesis in Panax ginseng. 36 (4), 442–448.
- Maillot, P., Lebel, S., Schellenbaum, P., Jacques, A. & Walter, B. (2009) Plant Physiology and Biochemistry Differential regulation of SERK, LEC1-Like and Pathogenesis-Related genes during indirect secondary somatic embryogenesis in grapevine. *Plant Physiology et Biochemistry*. [Online] 47 (8), Elsevier Masson SAS, 743–752. Available from: doi:10.1016/j.plaphy.2009.03.016.
- Oktavia, F., Siswanto, Budiani, A. & Sudarsono (2003) Embriogenesis somatik langsung dan regenerasi planlet kopi arabika (*Coffea arabica*) dari berbagai eksplan. *Menara Perkebunan*. 71 (2), 44–55.
- Orozco-Castillo, C., Chalmers, K.J., Waugh, R. & Powel W. (1994) Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 93:934-940.
- Pancaningtyas, S. (2013) Evaluasi Kuantitas dan Hiperhidrisitas Embrio Somatik Kakao Pada Kultur Padat, Kultur Cair, dan Subkultur Beruntun Evaluation of Quantity and Hyperhydricity of Cocoa Somatic Embryo Obtained from Solid Culture, Liquid Culture, and Sequence Subculture. 29 (April), 10–19.
- Priyono & Sumirat, U. (2012) Mapping of Quantitative Trait Loci (QTLs) Controlling Cherry and Green Bean Characters in the Robusta Coffee. (*Journal of Agricultural Science and Technology*. 2, 1029–1039.
- Samson, N.P., Campa, C., Gal, L.L., Noirot, 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.
- Santana-Buzzy, N., Rojas-Herrera, R., Rosa, M., Galaz-Ávalos, M; Ku-Cauich, R, J., Mijangos-Cortés., Gutierrez-Pacheco, L.C., Canto, A., Quiroz-Pacheco, F. & Loyalo-Vargas, V.M. (2007) Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 43, 507–520.
- Silva, F., Hermoso-gallardo, L. & Menéndez-yuffá, A. (2005) Primary and Secondary Somatic Embryogenesis in Leaf Sections and Cell Suspensions of *Coffea arabica* V.V.Catimor. *Interciencia*. 30 (11), 694–698.
- Silva, R.F. & Menéndez-yuffá, A. (2003) Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes gus and bar. 6 (1).

Sivanesan, I., Son, M.S., Jana, S. & Jeong, B.R. (2016) Secondary Somatic Embryogenesis in *Crocus vernus* (L.) Hill. *Propagation of Ornamental Plants*. 12 (3), 163–170.

Teressa, A., Crouzillat, D., Petiard, V. & Brouhan, P. (2010) Genetic diversity of Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. 1 (1), 63–79.

Yang, J., Wu, S. & Li, C. (2013) High Efficiency Secondary Somatic Embryogenesis in *Hovenia dulcis* Thunb . through Solid and Liquid Cultures. 2013.