

# Pemanfaatan Teknologi *In-Vitro* sebagai Metode Penyimpanan Embrio Kopi (*Coffea* sp.)

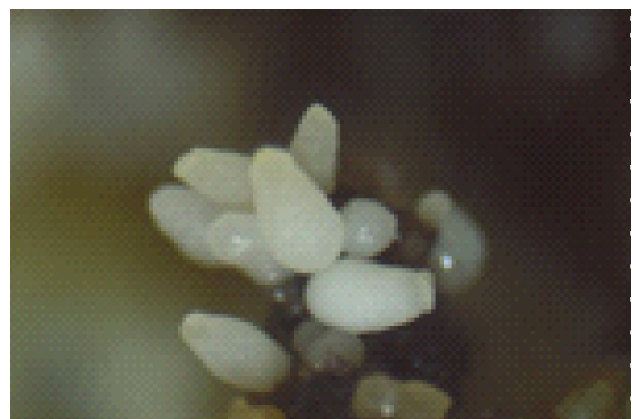
Fitria Ardiyani<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Jl. PB. Sudirman 90 Jember 68118

Teknik *in-vitro* banyak digunakan sebagai salah satu teknologi dalam perkembangan perkopian di Indonesia. Salah satu metode *in-vitro*, yaitu *tissue culture* atau kultur jaringan dapat digunakan sebagai cara perbanyakan tanaman kopi dengan menggunakan eksplan embriogenik. Manfaat lain dari teknologi *in-vitro* adalah untuk konservasi plasma nutfah. Teknik dalam metode *in-vitro* tersebut diharapkan dapat menyelesaikan salah satu permasalahan dalam kultur jaringan kopi yaitu sebagai cara penyimpanan embrio kopi dalam durasi waktu tertentu.

**T**eknologi *in-vitro* atau *tissue culture*, atau yang lebih dikenal dengan istilah kultur jaringan adalah metode yang banyak digunakan dalam perbanyakan tanaman pada kondisi lingkungan yang steril. Kultur jaringan juga dapat diartikan sebagai cara memperbanyak tanaman dengan menggunakan organ tanaman (embrio, tunas, bunga, dsb) atau jaringan tanaman (sel, kalus, protoplast) yang ditumbuhkan pada lingkungan khusus dan diatur pada kondisi aseptik. Beberapa manfaat yang diperoleh dari perbanyakan tanaman dengan metode ini adalah dapat menghasilkan tanaman dalam jumlah yang banyak dan waktu singkat dengan kualitas tanaman sama seperti induknya; mendapatkan tanaman yang bebas hama penyakit karena dibudidayakan pada kondisi yang steril; dapat digunakan untuk merekayasa/menciptakan varietas baru; dan dapat digunakan sebagai metode konservasi tanaman yang langka dan hampir punah.

Kultur jaringan telah banyak digunakan sebagai salah satu metode perbanyakan tanaman termasuk pada tanaman kopi. Awal mulanya,



metode kultur jaringan yang digunakan adalah dengan memanfaatkan embriozigotik. Seiring dengan perkembangan teknologi, saat ini metode kultur jaringan pada tanaman kopi telah menggunakan embrio somatik. Metode ini menggunakan eksplan berupa daun yang tumbuh menjadi kalus embriogenik dan dapat menghasilkan planlet kopi pada kondisi optimal. Salah satu hal yang membedakan metode embriozigotik dengan embriosomatik adalah pada embrio somatik eksplan akan tumbuh melewati tahapan pengkalusan. Pada tahapan inilah, eksplan dapat dimodifikasi dan diatur sesuai keinginan, baik

arah pertumbuhan maupun jumlah multiplikasinya. Metode ini dapat diterapkan pada semua jenis kopi dengan jenis media tumbuh dan lingkungan yang diatur secara spesifik.

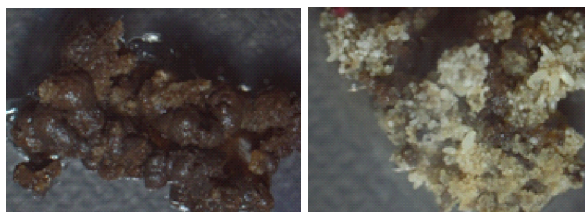
Selain menghasilkan planlet, perbanyak kopi dengan metode embrio somatik (*somatic embryogenesis*) juga menghasilkan embrio kopi. Embrio kopi dapat digunakan sebagai koleksi plasma nutfah, terutama untuk jenis-jenis kopi yang langka dan jarang ditemui. Embrio kopi tersebut dapat disimpan dalam jangka waktu tertentu dan dapat ditumbuhkan kembali ketika dibutuhkan. Penyimpanan embrio kopi dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa teknologi yang berbasis *in-vitro* antara lain: kultur tumbuh normal (untuk penyimpanan jangka pendek), kultur tumbuh minimal/*slow or reduced growth* (untuk penyimpanan jangka menengah) dan kultur tidak tumbuh/*suspended growth* (untuk penyimpanan jangka panjang)<sup>4</sup>. Pada prinsipnya, penyimpanan dengan basis *in-vitro* bertujuan untuk dapat menyimpan tanaman/eksplan dalam durasi waktu tertentu dan ketika dibutuhkan dapat segera diperbanyak dan digunakan. Keuntungan penyimpanan eksplan secara *in-vitro* antara lain lebih hemat biaya dan tenaga dalam perawatan, memerlukan area penyimpanan yang lebih sedikit, dan mengurangi resiko cekaman biotik dan abiotik yang sering terjadi di lapangan. Saat ini metode penyimpanan secara *in-vitro* telah dilakukan pada beberapa tanaman, antara lain jenis ubi-ubian, jahe merah, temu lawak, dan purwoceng. Dengan menggunakan beberapa literatur yang telah ada, metode penyimpanan secara *in-vitro* juga dapat diterapkan pada kultur jaringan kopi.

## Metode Kultur Normal

Kultur normal adalah kegiatan yang biasa dilakukan pada kultur jaringan. Kegiatan ini disebut dengan proses sub kultur. Eksplan akan mengalami proses sub kultur ketika sumber hara pada media tanam telah habis atau ketika eksplan memasuki tahapan kultur yang lebih lanjut. Sub kultur adalah proses memisahkan eksplan kultur jaringan (tunas, kalus, atau embrio) menjadi bagian yang lebih kecil atau sedikit, ke dalam media yang baru (jenis atau volume). Hal-hal yang menyebabkan sub kultur perlu dilakukan adalah berkurangnya volume media tanam, eksplan

sudah memenuhi ruang tumbuh, terjadi kondisi pertumbuhan yang tidak diinginkan (kontaminasi atau pencoklatan/*browning*), atau eksplan memerlukan komposisi media yang berbeda.

Sub kultur juga dapat digunakan sebagai metode penyimpanan plasma nutfah dalam jangka waktu yang pendek. Prinsip metode ini adalah memindahkan eksplan dari media lama yang kandungan unsur haranya telah habis ke dalam media baru, agar eksplan tetap hidup. Metode ini adalah metode penyimpanan *in-vitro* yang paling sederhana karena tidak memerlukan perlakuan khusus. Periode sub kultur dilakukan berdasarkan jenis tanaman dan jenis eksplan. Untuk eksplan kopi, sub kultur kalus/embrio dilakukan setiap 4–5 minggu sekali. Pelaksanaan metode ini membutuhkan media tanam dan tenaga kerja minimal sekali setiap bulan. Proses sub kultur harus dilakukan secara tepat karena eksplan akan mengalami kematian apabila media pertumbuhannya tidak optimal.



Kalus mati (kiri) dan kalus embriogenik (kanan)

Secara umum, penggunaan metode sub kultur sudah banyak dilakukan. Akan tetapi, ada beberapa kelemahan yang ditimbulkan dalam penggunaan metode tersebut, salah satunya adalah menurunnya viabilitas eksplan setelah beberapa periode sub kultur. Beberapa penelitian menyampaikan bahwa sub kultur yang terlalu sering akan mengakibatkan resiko kehilangan hasil yang cukup signifikan. Selain itu terdapat pula resiko terjadinya variasi somaklonal pada eksplan, apabila penimbunan hormon pertumbuhan akibat sub kultur berulang telah mencapai ambang batas aman. Hasil penelitian menyebutkan bahwa variasi somaklonal pada tanaman *Tetragonia hemsleyana* mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya waktu sub-kultur (terjadi setelah delapan kali sub-kultur)<sup>6</sup>. Oleh karena itu, metode penyimpanan ini dapat digunakan untuk penyimpanan jangka waktu pendek (kurang lebih 1 tahun).

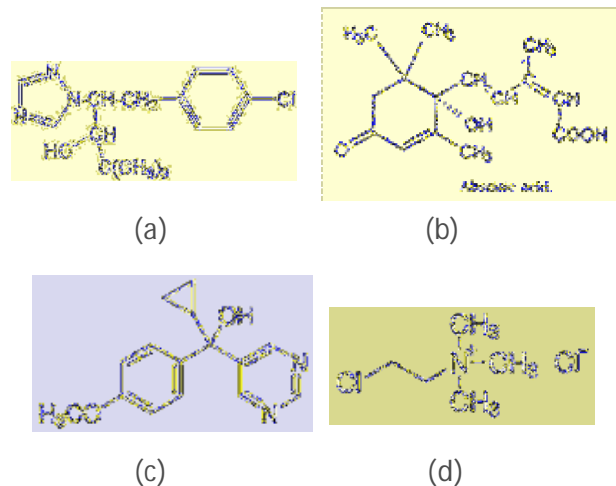
## Metode Pertumbuhan Lambat

Metode pertumbuhan lambat adalah salah satu metode yang digunakan untuk penyimpanan eksplan dengan periode waktu jangka menengah (lebih dari satu tahun). Sama halnya dengan metode sub kultur normal, metode ini juga memerlukan proses pemindahan eksplan dari media lama ke media baru, tetapi durasi waktunya lebih lama. Dengan demikian, frekuensi sub kultur dapat berkurang sehingga resiko terjadinya variasi somaklonal dapat diatasi. Perbedaan metode ini dengan metode sub kultur normal adalah pada metode pertumbuhan lambat digunakan teknik pengaturan laju metabolisme eksplan. Laju metabolisme dapat diatur menggunakan beberapa cara, yaitu modifikasi komponen media tumbuh dan modifikasi lingkungan tumbuh. Kedua cara tersebut dapat dilakukan secara independen ataupun dikombinasikan.

### a. Modifikasi Komponen Media

Modifikasi media tanam bertujuan membuat kondisi tanaman/eksplan tetap tumbuh akan tetapi tidak berkembang atau minimal perkembangan. Dari beberapa komponen media tanam, salah satu unsur yang dapat dikendalikan agar pertumbuhan eksplan menjadi minimal adalah Zat Pengatur Tumbuh (ZPT). ZPT dalam kultur jaringan diperlukan untuk mengendalikan dan mengatur pertumbuhan kultur tanaman. Dalam kultur jaringan terdapat berbagai jenis kelompok ZPT dan turunannya. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang optimal, penggunaan ZPT bersifat sangat spesifik dalam jenis maupun jumlahnya. Kelompok ZPT yang umum digunakan dalam pembuatan media tanam adalah auksin, sitokinin, dan giberalin. Pada pembuatan media tanam untuk embrio kopi, kombinasi yang tepat antara auksin dan sitokinin membuat embrio kopi tumbuh normal dan dapat berkembang menjadi planlet kopi dengan sempurna.

Dalam hubungannya dengan proses peminimalan pertumbuhan embrio, beberapa ZPT yang dapat digunakan adalah *Paclobutrazol* (PBZ), *Ancymidol*, *Cycocel* (*chloromequat chloride*), dan Asam absisat (ABA)<sup>2)</sup>. Unsur-unsur tersebut dapat mempengaruhi proses metabolisme eksplan sehingga dapat digunakan sebagai zat yang akan meminimalisir pertumbuhan.



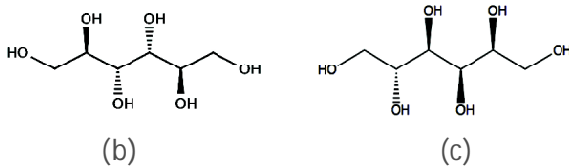
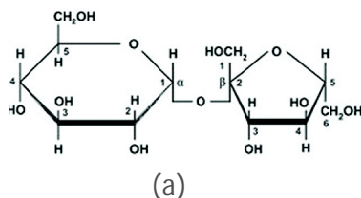
PLZ (a); ABA (b); Ancymidol (c) dan Cycocel (d)

*Paclobutrazol* (PBZ) merupakan zat penghambat pertumbuhan tanaman, sekaligus fungisida jenis triazole. PBZ bekerja dengan cara menghambat reaksi oksidasi dalam pembentukan giberalin (GA). Secara umum PBZ berfungsi untuk menurunkan pertumbuhan vegetatif tanaman sehingga dapat merangsang terjadinya pembungaan. Dalam kultur jaringan, zat ini sering dipakai untuk memperpanjang masa simpan. Sedangkan *Ancymidol* merupakan zat pengatur tumbuh yang mempunyai sifat menurunkan metabolisme jaringan dan dapat menghambat pertumbuhan vegetatif. *Ancymidol* pada konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan eksplan dengan cara menghalangi tahap pembentukan entkaurene menjadi ent-kaurenol serta oksidasi entkaurenol menjadi asam ent-kaurenoid pada lintasan biosintesis GA. Di samping itu, *ancymidol* juga dapat menghambat sintesis selulosa sehingga menghambat pemanjangan dinding sel<sup>2)</sup>. Akan tetapi, penggunaan *ancymidol* jarang dilakukan karena harganya yang relatif mahal.

*Cycocel* (*chloromequat chloride*) dapat berfungsi untuk menekan pertumbuhan tunas. Keadaan ini menyebabkan terhambatnya perpanjangan sel terutama di daerah meristem sub apikal sehingga menghambat tinggi tanaman. Adapun hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pemberian *Cycocel* adalah konsentrasi dan waktu pemberian yang tepat, karena pada konsentrasi tinggi *cycocel* dapat bersifat toksik bagi tanaman. Sedangkan Asam absisat (ABA) merupakan salah satu inhibitor dalam tanaman. Inhibitor ini mempunyai fungsi yang berlawanan dengan zat

pengatur tumbuh sehingga dapat menghambat pembelahan dan pemanjangan sel. ABA juga merupakan salah satu jenis inhibitor yang mendukung dormansi, *abscission*, dan *senscence*.

Selain penggunaan ZPT untuk memperpanjang usia simpan eksplan, dapat juga digunakan regulator osmotik. Regulator osmotik (osmoregulator) adalah suatu senyawa organik yang dapat mempengaruhi tekanan osmotik dalam media kultur sehingga mengurangi serapan hara mineral dan air oleh sel/jaringan yang mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan kultur<sup>3)</sup>. Pada kultur jaringan, osmoregulator yang paling sering digunakan adalah sukrosa, manitol, dan sorbitol. Penambahan unsur-unsur tersebut dapat mempengaruhi metabolisme eksplan sehingga dapat digunakan untuk memperpanjang masa simpan eksplan.



Sukrosa (a), Manitol (b), dan Sorbitol (c)

Sukrosa merupakan suatu disakarida yang dibentuk dari monomer-monomer-nya yang berupa unit glukosa dan fruktosa. Senyawa ini dikenal sebagai sumber nutrisi dan dibentuk oleh tumbuhan. Penambahan sukrosa dalam media berfungsi sebagai sumber karbon. Sukrosa merupakan salah satu unsur media tanam yang paling penting karena berfungsi sebagai sumber nutrisi yang dibutuhkan oleh eksplan. Sukrosa merupakan sumber karbon terbaik diikuti oleh glukosa, maltosa, dan raffinose. Sukrosa dalam konsentrasi yang sangat tinggi atau sangat rendah dapat menghambat pertumbuhan sel. Sifat tersebut dapat dimanfaatkan untuk mendapatkan komposisi media tanam yang akan digunakan sebagai media penyimpanan embrio.

Manitol dan sorbitol merupakan gula alkohol yang pada kondisi tertentu dapat menghambat pertumbuhan tanaman dengan cara mempengaruhi proses translokasi asimilatnya. Pada vanilla, penambahan manitol (10–15 g/L) atau pemberian sukrosa konsentrasi rendah (15–10 g/L) dapat menginduksi pertumbuhan lambat, sehingga 80–90% kultur dapat disimpan sampai 360 hari dengan syarat penyimpanan dalam wadah yang tertutup rapat dengan aluminium foil<sup>2)</sup>. Beberapa literatur tersebut dapat digunakan sebagai dasar untuk memperoleh media penyimpanan yang tepat bagi eksplan/embrio kopi dengan penambahan osmoregulator pada konsentrasi tertentu.

## b. Modifikasi Lingkungan Fisik

Selain dengan modifikasi komponen media, lingkungan fisik untuk penyimpanan eksplan/embrio kopi juga harus diperhatikan. Lingkungan fisik kultur jaringan (suhu, kelembaban relatif, dan cahaya) merupakan hal yang esensial bagi eksplan untuk dapat berkembang. Begitu pula dengan embrio kopi pada kultur jaringan. Embrio kopi dapat tumbuh normal apabila berada dalam kondisi lingkungan yang tepat, seperti kebutuhan cahaya minimal, kelembaban cukup, dan suhu. Sedangkan untuk pemberian cahaya pada eksplan juga berpengaruh, karena pemberian cahaya minimal akan mempengaruhi kinerja hormon pertumbuhan sehingga metabolisme eksplan akan berlangsung perlahan. Untuk tujuan penyimpanan, biasanya digunakan suhu rendah, berkisar antara 16-18°C karena dengan suhu rendah metabolisme yang terjadi pada sel tanaman akan berjalan lambat dan pada akhirnya dapat memperpanjang waktu penyimpanan. Faktor lingkungan tumbuh dapat diatur sedemikian rupa sehingga proses pertumbuhan eksplan/embrio kopi dapat berlangsung secara minimal.

## Metode Kriopreservasi

Selain metode kultur normal dan metode pertumbuhan lambat, metode lain yang dapat digunakan untuk menyimpan embrio supaya tetap hidup tetapi tidak tumbuh adalah metode kriopreservasi. Metode ini dapat digunakan untuk

peyimpanan eksplan dalam jangka waktu panjang. Kriopreservasi adalah teknik penyimpanan dengan memanfaatkan suhu yang sangat rendah (-196°C) pada media *cryogenic*. Keunggulan dari teknik ini adalah tidak merubah kestabilan genetik dari waktu ke waktu; tidak membutuhkan ruang penyimpanan yang besar; dan mengurangi biaya pemeliharaan jangka panjang ketika banyak strain yang harus dipertahankan. Sedangkan kelemahan kriopreservasi adalah membutuhkan teknik khusus pada pelaksanaannya; membutuhkan fasilitas *back up* yang lebih tinggi untuk ketahanan eksplan, perlu penanganan ekstra setelah kultur dicairkan dari kondisi beku; membutuhkan nitrogen cair atau alat pembeku pada suhu yang sangat rendah (-150°C) yang dapat diandalkan; dan membutuhkan 2–3 minggu untuk menghasilkan kultur yang tumbuh vigor dari hasil pembekuan<sup>1)</sup>.

Secara umum metode kriopreservasi terdiri dari beberapa tahapan yaitu perlakuan pra-tumbuh, pra-kultur, pemuatan (*loading*), dehidrasi jaringan, pembekuan, pencairan (*thawing*), dan pemulihan (*recovery*). Teknik kriopreservasi pada berbagai sel, jaringan, dan organ telah banyak dilakukan, demikian juga dengan kriopreservasi embrio. Salah satu cara penyediaan embrio yang telah banyak dilakukan adalah pengawetan dengan metode *freezing* atau pembekuan melalui *slow freezing*, *rapid freezing*, dan *ultra rapid freezing*. Penggunaan kriopreservasi pada kultur jaringan pernah dilakukan pada embrio kakao. Metode ini dapat digunakan untuk menyimpan kalus embriogenik, embrio somatik kakao, yang dapat digunakan sebagai materi perbanyak tanaman kakao secara klonal<sup>5)</sup>.

## Penutup

Beberapa metode penyimpanan berbasis *in vitro* yang telah disampaikan dapat digunakan sebagai dasar dalam menentukan metode penyimpanan yang tepat untuk embrio kopi. Dengan metode penyimpanan yang tepat, maka embrio kopi dapat disimpan dalam jangka waktu tertentu dan dapat ditumbuhkan kembali ketika dibutuhkan. Manfaat lain dari metode ini adalah meminimalisir resiko kehilangan plasma nutfah kopi unggul. Pada perkembangannya, akan sangat memungkinkan apabila teknik penyimpanan embrio berbasis *in-vitro* juga dapat diterapkan pada tanaman lain.

## Sumber Pustaka

- <sup>1</sup>Day, J.G. & J.J. Brand (2005). *Alga Culturing Techniques: Cryopreservation methods for maintaining microalgal cultures* (Chapter 12). Academic press.
- <sup>2</sup>Dewi, N., S.D. Iswari & I. Roostika. (2014). Pemanfaatan Teknik Kultur In Vitro untuk Konservasi Plasma Nutfah Ubi-ubian. *Jurnal Agro Biogen*. 10, 34–44.
- <sup>3</sup>Dodds, J.H. & L.W. Roberts (1985). *Experiments in Plant Tissue Culture*. 2<sup>nd</sup> Edition. Cambridge University Press. Cambridge, UK. 232 p.
- <sup>4</sup>Dube, P.; M. Gangopadhyay; S. Dewanjee & M.N. Ali. (2011). Establishment of a rapid multiplication protocol for *Coleus forskohlii* Briq. and *in vitro* conservation by reduced growth. *Indian Journal of Biotechnology*. 10, 228–231.
- <sup>5</sup>Pancaningtyas, S. (2013). Perkembangan teknologi kriopreservasi pada tanaman serta peluang penerapannya pada kakao. (*Theobroma cacao* L.). *Review Penelitian Kopi dan Kakao*, 1, 12–23.
- <sup>6</sup>Peng, X.; T.T. Zhang & J. Zhang. (2015). Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastig hemsleyanum* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122, 67–77.

\*\*0\*\*

**Hypotan**

- Pengendali hama PBKo yang efektif, efisien, dan ramah lingkungan  
- Aplikasi dilapangan sangat mudah

**Terbukti Ampuh Mengendalikan Hama PBKo**

Serangga hama penggerek buah kopi (PBKo, *Hypothenemus hampei*) merupakan hama yang sangat merusak pada buah kopi sehingga mengakibatkan penurunan produksi dan kualitas hasil secara nyata. Berdasarkan hasil-hasil penelitian yang telah dilakukan, Puslitkoka telah menghasilkan formulasi senyawa penarik (*attractant*) PBKo yang disebut dengan HYPOTAN 500 SL beserta alat perangkannya. Hasil penelitian di lapangan menunjukkan keragaan yang sangat baik, efektif, efisien dan ramah lingkungan.