

Kultur Jaringan Tanaman Kopi

Rina Arimarsetiowati¹⁾

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

Kultur jaringan merupakan cara memperbanyak tanaman secara vegetatif dalam media buatan yang dilakukan dalam kondisi steril (*in vitro*). Adanya sifat totipotensi sel tanaman maka sel tanaman dapat meregenerasi menjadi individu tanaman di dalam media buatan. Keberhasilan produksi bibit dengan kultur jaringan dipengaruhi oleh kondisi eksplan, wadah kultur, dan media kultur. Untuk memperbanyak kultur jaringan kopi, sumber eksplan yang digunakan adalah daun muda (*flush*) yang kemudian diinduksi menjadi kalus dan dikembangkan menjadi embrio somatik. Melalui tahapan ini berhasil diproduksi bibit kopi secara massal di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia.



Kultur jaringan (*tissue culture*) pada tanaman kopi merupakan suatu cara atau metode untuk mengisolasi bagian tanaman khususnya jaringan, sekelompok sel yang ditumbuhkan dengan lingkungan tumbuhan yang aseptik atau steril (dalam botol kultur) pada media nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman sehingga tanaman dapat memperbanyak diri menjadi tanaman lengkap seperti induknya. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah memperbanyak tanaman menggunakan bagian vegetatif tanaman pada media buatan yang dilakukan di tempat steril.

Menurut Suryowinoto (1991), kultur adalah budidaya dan jaringan adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Jadi, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang memiliki sifat seperti induknya. Metode kultur jaringan dikembangkan untuk membantu memperbanyak tanaman, khususnya untuk tanaman yang sulit dikembangbiakkan secara generatif. Kultur jaringan termasuk jenis pengembangbiakan vegetatif yang prinsip dasarnya sama dengan setek. Bagian tanaman yang akan dikultur (eksplan) dapat diambil dari akar, pucuk, bunga, daun, batang, meristem dan serbuk

sari. Pada kultur jaringan tanaman kopi biasanya menggunakan eksplan daun muda (*flush*) sebagai bahan induksi untuk membentuk kalus yang kemudian akan membentuk embrio.

Menurut Thorpe (1981), ada tiga prinsip utama kultur jaringan tanaman yaitu:

1. Isolasi bagian tanaman dari tanaman utuh (akar, batang, daun).
2. Memelihara bagian tanaman tersebut dalam lingkungan yang sesuai dan kondisi kultur yang tepat.
3. Pemeliharaan dalam kondisi aseptik.

Melalui kultur jaringan, tanaman dapat diperbanyak setiap waktu sesuai kebutuhan sebab tingkat multiplikasinya yang tinggi. Bibit dari varietas unggul yang jumlahnya terbatas dapat segera dikembangkan melalui kultur jaringan. Perbanyak tanaman melalui kultur jaringan, bila berhasil dapat lebih menguntungkan karena sifatnya akan sama dengan induknya (seragam) dan dalam waktu yang singkat bibit tanaman dapat diproduksi dalam jumlah banyak dan bebas penyakit.

Jaringan tanaman bisa dikulturkan karena setiap sel memiliki sifat totipotensi, yaitu kemampuan sel untuk meregenerasi menjadi tanaman lengkap. Teori totipotensi sel ini yang melandasi kultur jaringan sudah lama diungkap oleh Schwann & Schleiden (1898). Berdasarkan teori totipotensi tersebut setiap sel tanaman hidup dilengkapi dengan informasi genetik dan perangkat fisiologis yang lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman utuh, jika kondisinya sesuai.

Beberapa Metode Kultur Jaringan Tanaman

1. Kultur biji, yaitu kultur yang bahan tanamnya menggunakan biji (*seedling*).
2. Kultur organ, merupakan budidaya yang bahan tanamnya menggunakan organ, seperti ujung akar, pucuk aksilar, tangkai daun, helaian daun, bunga, buah muda, buku batang, akar dan lain-lain.
3. Kultur kalus, yaitu kultur yang menggunakan jaringan (sekumpulan sel) biasanya merupakan jaringan parenkim sebagai bahan eksplannya.
4. Kultur suspensi sel, adalah kultur yang menggunakan media cair dengan pengocokan yang terus-menerus menggunakan *shaker* dan menggunakan sel atau agregat sel sebagai bahan eksplannya, biasanya eksplan yang digunakan berupa kalus atau jaringan meristem.

5. Kultur protoplasma, adalah kultur yang menggunakan sel sebagai eksplan yang telah dilepas bagian dinding selnya menggunakan bantuan enzim. Protoplas diletakkan pada media padat dibiarkan agar membelah diri dan membentuk dinding sel kembali. Kultur protoplas biasanya untuk keperluan hibridisasi somatik atau fusi sel soma (fusi 2 protoplas baik intraspesifik maupun interspesifik).
6. Kultur haploid, untuk mendapatkan tanaman haploid yaitu kultur yang berasal dari bagian reproduktif tanaman, seperti kepala sari (kultur *anther*) tepung sari (kultur *pollen*), *ovule* (kultur *ovule*).

Faktor yang Berpengaruh dalam Kultur Jaringan Kopi

Faktor-faktor yang mempengaruhi perbanyak tanaman kopi dengan metode kultur jaringan antara lain eksplan atau bagian tanaman yang dipergunakan sebagai bahan awal untuk dikulturkan, wadah dan media tumbuh yang steril serta lingkungan tumbuh. Faktor eksplan yang penting adalah genotipe/ varietas, umur eksplan dan letak pada cabang. Bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai eksplan adalah pucuk daun muda. Media tumbuh untuk perbanyak tanaman dengan kultur jaringan mengandung komposisi garam anorganik, asam amino, dan zat pengatur tumbuh. Media tersebut berfungsi untuk penyediaan air, hara mineral, vitamin, zat pengatur tumbuh, akses ke atmosfer untuk pertukaran gas, dan pembuangan sisa metabolisme tanaman pada proses regenerasi kultur jaringan. Lingkungan tumbuh yang dapat mempengaruhi regenerasi tanaman meliputi pH, temperatur, panjang penyinaran, intensitas penyinaran, kualitas sinar, kelembaban, dan ukuran wadah kultur.

Tahapan Kultur Jaringan Kopi

1. Pembuatan media

Media merupakan faktor penentu dalam perbanyak kultur jaringan tanaman kopi. Media yang digunakan terdiri dari garam mineral, vitamin, hormon, agar, gula, dan lain-lain. Media ditempatkan pada tabung reaksi atau botol-botol kaca atau erlenmeyer (untuk media cair).

2. Pengambilan eksplan

Bagian tanaman yang sering digunakan untuk perbanyak adalah daun yang masih muda (jaringan meristematis).

3. Sterilisasi

Proses pembebasan dari mikroorganisme terhadap eksplan, media, dan peralatan yang akan digunakan dalam kegiatan kultur jaringan. Peralatan logam dan gelas disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Alat tanam seperti pinset, gunting dan *scalpel* dapat disterilkan dengan pembakaran atau dengan pemanasan pada suhu 250°C dan dengan pencelupan dalam alkohol. Alat-alat kultur jaringan yang perlu disterilisasi adalah pinset, gunting, gagang *scalpel*, kertas saring, *petridish*, botol-botol kosong, erlenmeyer, dan pipet. Peralatan juga harus disterilkan dengan menggunakan etanol yang disemprotkan secara merata. Sterilisasi juga dilakukan pada eksplan yang akan dikulturkan menggunakan bahan deterjen, kemudian merendamnya dalam larutan klorok 30%, larutan benlate, dan alkohol (1 menit) kemudian dicuci dengan air steril agar tidak terkontaminasi oleh jamur atau bakteri.

4. Inisiasi kultur

Tahapan menanam eksplan pada media kultur. Kegiatan ini dilakukan di dalam *laminar air-flow* untuk menghindari kontaminasi mikroorganisme yang dapat menyebabkan gagalnya pertumbuhan eksplan. Dalam tahap ini dapat dilakukan pemilihan bagian tanaman yang tumbuhnya paling baik untuk perbanyak (multiplikasi) tahap selanjutnya. Tabung reaksi atau botol kultur yang telah ditanami eksplan diletakkan pada rak-rak dan ditempatkan di tempat yang steril dengan suhu kamar.

5. Pemeliharaan eksplan

Eksplan yang telah ditanam, agar tumbuh menjadi kalus dan menjadi planlet, membutuhkan pemeliharaan yang tepat dan kontinyu. Eksplan atau kalus yang sudah waktunya untuk dipindahkan ke dalam media tanam yang baru harus segera dikerjakan, tidak boleh terlambat. Keterlambatan pemindahan eksplan dapat menyebabkan pertumbuhan eksplan atau kalus terhenti atau bahkan mengalami *browning* dan terkontaminasi oleh jamur atau bakteri.

6. Pengamatan eksplan

Kegiatan ini dilakukan pada fase saat eksplan menunjukkan pertumbuhan tunas dan akar. Tahap ini berarti proses kultur jaringan telah

berhasil dilakukan dengan baik. Pengamatan dilakukan setiap hari untuk melihat pertumbuhan dan perkembangan tunas dan akar serta untuk melihat adanya kontaminasi oleh bakteri atau jamur. Eksplan yang terkontaminasi menunjukkan gejala seperti berwarna putih atau hitam dengan adanya bulu-bulu halus (disebabkan jamur) atau cairan busuk (disebabkan bakteri).

7. Aklimatisasi

Tahap akhir pemindahan planlet yang telah bertunas dan berakar dari kondisi *in vitro* ke pembibitan (bedengan). Pemindahan dilakukan secara hati-hati dan menggunakan sungkup. Sungkup berfungsi untuk melindungi bibit dari udara luar dan serangan hama/penyakit karena bibit hasil kultur jaringan sangat peka terhadap serangan hama dan penyakit. Setelah bibit mampu beradaptasi dengan lingkungan baru, sungkup dilepaskan secara bertahap, selanjutnya pemeliharaan bibit dilakukan sesuai standar pemeliharaan bibit konvensional.

Teknik Kultur Jaringan Kopi

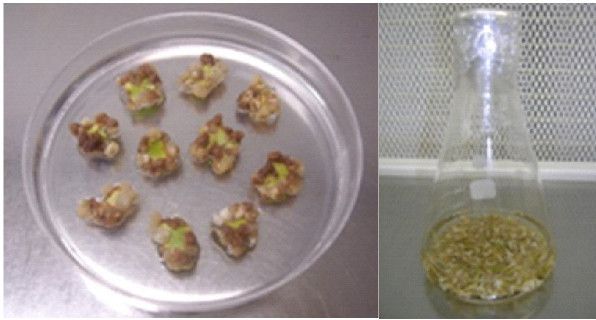
Secara umum ada dua teknik kultur jaringan kopi yang lazim digunakan, yaitu :

1. Kultur padat

Kultur padat digunakan untuk menghasilkan kalus kemudian kalus dipindah ke dalam media diferensiasi untuk menumbuhkan akar dan tunas sehingga kalus dapat terdiferensiasi menjadi planlet. Media kultur padat mengandung semua unsur kimia yang dibutuhkan tanaman lalu dipadatkan dengan menambahkan zat pemat, berupa agar-agar yang khusus ditujukan untuk media padat dalam kultur jaringan. Media yang terlalu padat akan mengakibatkan akar sulit untuk menembus ke dalam media. Sedangkan media yang terlalu lembek menyebabkan kegagalan dalam pekerjaan. Kegagalan dapat berupa tenggelamnya eksplan yang ditanam. Eksplan yang tenggelam tidak dapat tumbuh menjadi kalus sebab tempat area kalus yaitu pada irisan (jaringan yang luka) tertutup oleh media. Kultur padat dapat digunakan untuk metode kloning, menumbuhkan protoplas setelah diisolasi, menumbuhkan planlet dari protokormus setelah dipindahkan dari suspensi sel, dan menumbuhkan planlet dari protoplas yang sudah difusikan (digabungkan).

2. Kultur cair

Penggunaan kultur cair ini lebih ditekankan untuk suspensi sel yaitu untuk menumbuhkan "plb" (*protocorm like bodies*). Dari protokormus ini akan tumbuh menjadi planlet apabila dipindahkan ke dalam media padat yang sesuai. Pembuatan media cair jauh lebih cepat dari pada media padat karena tidak perlu memanaskannya untuk melarutkan agar-agar. Media cair tidak memerlukan zat pematat sehingga keadaannya tetap berupa larutan nutrisi.



Media padat (kiri) dan media cair (kanan)

Peralatan Kultur Jaringan Tanaman Kopi

1. *Laminar air-flow cabinet*, alat ini letaknya di ruang transfer yaitu ruang yang harus selalu dalam keadaan steril. Alat ini digunakan dalam proses penanaman eksplan dan pemindahan eksplan dari tahapan sub kultur pertama ke tahapan sub kultur selanjutnya.
2. *Shaker* (penggojok), merupakan alat penggojok yang putarannya dapat diatur sesuai dengan kecepatan yang dikehendaki. Penggojok ini berfungsi memacu multiplikasi sel/kalus dan berfungsi dalam proses pendewasaan embrio.
3. *Autoclave*, merupakan alat sterilisasi peralatan dan media kultur.
4. Timbangan analitik. Alat ini bermacam-macam tetapi yang penting adalah timbangan yang dapat digunakan untuk menimbang sampai satuan yang sangat kecil (miligram). Alat ini berfungsi untuk menimbang bahan-bahan kimia yang digunakan dalam kultur jaringan.
5. *Stirrer*, alat ini berfungsi untuk menggojok atau mengaduk dengan sistem pemanas. Dengan menggunakan listrik, alat ini berfungsi sebagai kompor di samping sebagai penggojok.
6. Erlenmeyer, alat ini berfungsi sebagai sarana menuangkan air suling maupun untuk tempat media kultur dan penanaman eksplan.
7. Gelas ukur, digunakan untuk menakar air suling dan bahan kimia yang akan digunakan.
8. Gelas piala, digunakan untuk menuangkan atau mempersiapkan bahan kimia dan air suling dalam pembuatan media.
9. *Petridish*, merupakan cawan petri yang mutlak dibutuhkan dalam kultur jaringan sebagai tempat eksplan ditumbuhkan selain dalam botol.
10. Pinset dan *scalpel*. Pinset digunakan untuk memegang atau mengambil irisan eksplan atau untuk menanam eksplan. *Scalpel* atau pisau digunakan untuk memotong eksplan.
11. Lampu spiritus, digunakan untuk sterilisasi *scalpel* dan pinset di dalam *laminar air-flow cabinet* pada saat mengerjakan penanaman eksplan atau subkultur eksplan.
12. Tabung reaksi, digunakan pada saat mengerjakan isolasi protoplas dan isolasi kloroplas.
13. Steri 250, merupakan alat pemanas untuk sterilisasi pinset dan *scalpel* dengan menggunakan suhu 250°C sehingga bebas dari kontaminasi jamur dan bakteri.



Shaker, botol kultur, dan kegiatan dalam laminar air-flow cabinet

Masalah yang Terjadi dalam Kultur Jaringan Kopi

1. Kontaminasi

Kontaminasi adalah gangguan yang sangat umum terjadi dalam kultur jaringan kopi. Kontaminasi dapat berupa munculnya jamur, bakteri, virus dan lain-lain. Upaya mencegah kontaminasi dengan membiasakan membersihkan berbagai sarana yang diperlukan dalam kultur jaringan serta memastikan bahwa proses sterilisasi media dilakukan secara baik dan benar. Cara untuk mengurangi kontaminasi jamur dan bakteri dalam kultur jaringan kopi antara lain dengan merawat tanaman induk dalam kondisi kekeringan selama 3–4 minggu sebelum dilakukan pengambilan eksplan. Tanaman diberi air yang cukup, dipupuk, dan diberi pestisida atau fungisida. Pada saat memulai kultur jaringan, eksplan daun dicuci bersih, dan bagian yang tidak akan dikulturkan segera dibuang misalnya tulang daun dan tepi daun. Pembersihan meliputi pencucian, penggosokan secara merata untuk membuang semua partikel tanah dan daun mati.

2. Pencokelatan (*browning*)

Pencokelatan adalah suatu karakter alamiah munculnya warna cokelat atau hitam yang sering sebagai tanda gagalnya pertumbuhan dan perkembangan eksplan kopi. Hal ini disebabkan oleh senyawa fenol yang timbul akibat stres mekanik akibat pelukaan saat proses isolasi eksplan dari tanaman induk. Senyawa fenol tersebut bersifat toksik sehingga menghambat pertumbuhan dan bahkan dapat mematikan jaringan eksplan.

3. Vitrifikasi

Vitrifikasi adalah masalah dalam kultur jaringan tanaman kopi yang ditandai oleh munculnya pertumbuhan dan perkembangan yang tidak normal seperti tanaman yang dihasilkan pendek-pendek, pertumbuhan batang cenderung ke arah penambahan diameter, tanaman terlihat berwarna transparan dan daunnya tidak memiliki jaringan palisade.

4. Variabilitas genetik

Bila kultur jaringan tanaman kopi digunakan sebagai upaya perbanyakan tanaman yang

seragam dalam jumlah banyak, dan bukan sebagai upaya pemuliaan tanaman, maka adanya variasi genetik menjadi kendala. Variasi genetik dapat terjadi pada kultur *in vitro* karena laju multiplikasi yang tinggi, subkultur berulang yang tidak terkontrol dan penggunaan teknik yang tidak sesuai. Variasi genetik yang paling umum terjadi pada kultur kalus dan kultur suspensi sel karena munculnya sifat kromosom yang tidak stabil, teknis kultur, media, dan hormon.

5. Pertumbuhan dan perkembangan

Masalah yang berkaitan dengan proses pertumbuhan dan perkembangan apabila eksplan yang ditanam mengalami stagnasi dari mulai tanam sampai kurun waktu tertentu tidak mati tetapi tidak tumbuh. Hal ini dapat dicegah dengan penanaman eksplan yang memiliki jaringan meristematik dan juvenil karena awal pertumbuhan eksplan dimulai dari sel-sel muda yang aktif membelah. Media juga dapat menjadi penyebab terjadi stagnasi pertumbuhan karena dari kondisi media suatu sel dapat/tidak terdorong melakukan proses pembelahan. Pada proses kultur jaringan yang bersifat *indirect embryogenesis*, tahapan pembentukan kalus harus dilanjutkan dengan mendorong induksi embrio somatik dari sel-sel kalus. Embrio somatik dapat terjadi secara endogen ataupun eksogen dan secara langsung maupun tidak langsung.

6. Lingkungan mikro

Suhu ruangan inkubator sangat menentukan optimasi pertumbuhan eksplan. Suhu yang terlalu rendah atau tinggi dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan eksplan.

Penutup

Kultur jaringan telah berhasil digunakan untuk perbanyakan tanaman kopi secara massal. Keberhasilan tersebut membawa babak baru dalam sistem pembibitan kopi yang selama ini dilakukan secara konvensional menggunakan setek. Melalui cara perbanyakan ini kualitas dan kuantitas bibit yang diproduksi dapat ditingkatkan secara spektakuler, kemurnian genetik terjaga dan keseragaman tumbuh tanaman lebih baik. Meskipun demikian masih perlu upaya perbaikan teknik perbanyakan kultur jaringan agar proses produksi bibit kopi secara klonal akan semakin efektif dan efisien.