

Mikropropagasi *Coffea arabica* L. Klon AS2K Melalui Embriogenesis Somatik dan Transformasi Genetik dengan Gen *AtRKD4*

Rina Arimarsetiowati
19/450143/SBI/00171

INTISARI

Kopi merupakan komoditas penting dan mempunyai nilai ekonomi yang tinggi di Indonesia. Terdapat dua jenis kopi yang berkembang yaitu *Coffea canephora* (Kopi Robusta) dan *Coffea arabica* L. (Kopi Arabika). *C. arabica* L. mempunyai cita rasa yang unik dan mempunyai kualitas superior sebagai minuman dibandingkan Kopi Robusta. Perbanyakkan *C. arabica* L. dapat ditingkatkan melalui mikropropagasi dengan induksi embriogenesis somatik dan penyisipan gen *AtRKD4* yaitu gen inisiasi embrio pada *Arabidopsis thaliana* untuk menginisiasi pembentukan embrio somatik pada kopi. Mikropropagasi melalui embrio somatik yang efektif dan transformasi genetik yang *reliable* dan *reproducible* pada *Coffea arabica* L. sangat diperlukan. Mikropropagasi melalui embriogenesis somatik pada *C. arabica* L. klon AS2K dilakukan dengan kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) auksin dan sitokinin dengan berbagai konsentrasi pada setiap tahapan embriogenesis somatik. Penelitian ini bertujuan untuk 1) Mengetahui kombinasi dan konsentrasi ZPT dalam mikropropagasi *Coffea arabica* L. klon AS2K melalui embriogenesis somatik; 2) Menentukan durasi waktu dan konsentrasi terbaik untuk perendaman eksplan *C. arabica* L. klon AS2K dalam kultur *Agrobacterium tumefaciens* pembawa T-DNA dengan konstruksi 35S::*GR::AtRKD4*; 3) Mendeteksi terjadinya integrasi T-DNA pembawa konstruksi 35S::*GR::AtRKD4* ke dalam genom transforman *C. arabica* L. klon AS2K; 4) Menentukan frekuensi transformasi genetik pembawa konstruksi 35S::*GR::AtRKD4* pada *C. arabica* L. klon AS2K melalui perantaraan *A. tumefaciens*; 5) Membandingkan fenotip embrio *C. arabica* L. klon AS2K hasil transformasi genetik melalui perantaraan *A. tumefaciens* dengan embrio non transforman dan 6) Mendeteksi ekspresi transgen *AtRKD4* dalam menginisiasi pembentukan embrio somatik pada transforman *C. arabica* L. klon AS2K.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi dan konsentrasi ZPT 1 mg/L 2,4-D dan 1 mg/L BAP dalam media MS merupakan media terbaik dalam induksi kalus *C. arabica* L. klon AS2K dengan persentase keberhasilan 60% pada 56 hari setelah kultur. Media terbaik dalam regenerasi embrio somatik mengandung 2 mg/L BAP tanpa menggunakan arang aktif yang menghasilkan 16 embrio fase globular, 2 embrio fase hati, 6 embrio fase torpedo dan 2 embrio fase kotiledon pada 90 hari setelah kultur. Kombinasi media terbaik dalam regenerasi planlet mengandung 3 mg/L BAP dan 0,5 mg/L GA₃ dan kombinasi 3 mg/L BAP dan 1 mg/L GA₃ dengan jumlah 3 daun dan 2 akar pada 84 hari setelah kultur.

Pada penelitian transformasi genetik dengan perantaraan *Agrobacterium tumefaciens* pembawa T-DNA dengan konstruksi 35S::*GR::AtRKD4*, durasi waktu terbaik dalam perendaman eksplan *C. arabica* L. klon AS2K dalam kultur

Agrobacterium adalah 10 menit dengan konsentrasi OD₆₀₀ sebesar 0,6. Penelitian ini berhasil mendeteksi terjadinya integrasi T-DNA pembawa konstruksi 35S::*GR*::*AtRKD4* ke dalam genom planlet transforman *C. arabica* L. klon AS2K dengan adanya pita fragmen DNA amplifikasi gen *AtRKD4* ukuran 382 bp, gen *HPT* dengan ukuran 545 bp dan gen *Actin* 114 bp pada gel elektroforesis. Pada sampel planlet non-transforman tidak terdapat pita gen *AtRKD4* ukuran 382 bp, gen *HPT* dengan ukuran 545 bp, namun terdapat pita gen *Actin* dengan ukuran 114 bp pada gel elektroforesis. Frekuensi transformasi genetik dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* pembawa T-DNA dengan konstruksi 35S::*GR*::*AtRKD4* pada *C. arabica* L. klon AS2K sebesar 1,52%.

Ekspresi transgen *AtRKD4* berhasil menginisiasi pembentukan embrio somatik secara langsung tanpa pembentukan kalus pada *C. arabica* L. klon AS2K. Induksi embrio somatik dengan menggunakan eksplan daun planlet transforman menunjukkan kemampuan induksi embrio somatik lebih cepat dibandingkan dengan planlet non-transforman dengan persentase pembentukan embrio somatik lebih tinggi dibandingkan dengan eksplan daun planlet non-transforman. Pembentukan embrio somatik, perkecambahan embrio somatik dan regenerasi planlet pada planlet transforman menunjukkan fenotip yang sama dengan planlet non-transforman *C. arabica* L. klon AS2K. Ekspresi transgen *AtRKD4*, *HPT* dan *Actin* pada planlet transforman *C. arabica* L. klon AS2K yang diinduksi dengan 1 mg/L 2,4-D dan 1 mg/L BAP menghasilkan ampikon sepanjang 382 bp, 545 bp dan 114 bp. Namun tidak terdeteksi pada potongan daun planlet non-transforman. *Actin* terekspresi pada semua sampel planlet. Ekspresi transgen *AtRKD4* pada level translasi diketahui dengan adanya pembentukan protein dengan berat molekul 28,54 kDa dan 28,78 kDa pada *C. arabica* L. klon AS2K pembawa 35S::*GR*::*AtRKD4* setelah diberi perlakuan 1 mg/L 2,4-D dan 1mg/L BAP selama 7 hari.

Kata kunci: *Agrobacterium tumefaciens*, *AtRKD4*, auksin, *C. arabica* L, embriogenesis somatik, sitokinin

Micropropagation of AS2K Clones *Coffea arabica* L. Through Somatic Embryogenesis and Genetic Transformation with the *AtRKD4* Gene

Rina Arimarsetiowati
19/450143/SBI/00171

ABSTRACT

Coffee is an important commodity and has high economic value in Indonesia. Two types of coffee are developed, namely *Coffea canephora* (Robusta Coffee) and *Coffea arabica* L. (Arabica Coffee). *C. arabica* L. has a unique taste and has superior quality as a drink compared to Robusta coffee. Propagation of *C. arabica* L. can be increased through micropropagation with somatic embryogenesis induction and the insertion of the *AtRKD4* gene as the embryo initiation gene in *Arabidopsis thaliana* to initiate somatic embryo formation in coffee. The effective of micropropagation somatic embryo, reliable and reproducible genetic transformation of *C. arabica* L. is urgently needed. Micropropagation through somatic embryogenesis in AS2K clones *C. arabica* L. was carried out with the combinations of plant growth regulator (PGR) of auxin and cytokinins with various concentrations at each stage of somatic embryogenesis. The objectives of this research are 1) Determine the combination and concentration of PGR in micropropagation of AS2K clones *C. arabica* L. through somatic embryogenesis; 2) Determine the best time duration and concentration for immersing AS2K clones *C. arabica* L. explants in *Agrobacterium tumefaciens* culture carrying T-DNA construction with *35S::GR::AtRKD4*; 3) Detect the integration of T-DNA carrying the *35S::GR::AtRKD4* construction's into the AS2K clones *C. arabica* L. transformant genome; 4) Determine the frequency of genetic transformation mediated *A. tumefaciens* in AS2K clones *C. arabica* L. carrying *35S::GR::AtRKD4* construction's; 5) Compare the phenotypes of AS2K clones *C. arabica* L. embryos resulting from genetic transformation mediated *A. tumefaciens* with non-transformant embryos and 6) Detect the expression of the *AtRKD4* transgene to initiate the formation of somatic embryos in AS2K clones *C. arabica* L. transformants.

The results showed that the combination and concentration of PGR 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP in MS medium was the best medium for callus induction of AS2K clones *C. arabica* L. with the percentages of 60% at 56 days after culture. The best medium for regenerating somatic embryos contained 2 mg/L BAP without using activated charcoal which produced 16 globular phase embryos, 2 heart phase embryos, 6 torpedo phase embryos and 2 cotyledons phase embryos at 90 days after culture. The best combination medium for plantlet regeneration contained 3 mg/L BAP and 0.5 mg/L GA₃ and a combination of 3 mg/L BAP and 1 mg/L GA₃ with a total of 3 leaves and 2 roots at 84 days after culture.

In the genetic transformation mediated *Agrobacterium tumefaciens* carrying T-DNA with the *35S::GR::AtRKD4* construction, the best duration of immersion of AS2K clones *C. arabica* L. explants in *Agrobacterium* culture was 10 minutes

with an OD₆₀₀ concentration of 0.6. This study was successful in detecting the integration of T-DNA carrying the 35S::*GR*::*AtRKD4* construction into the AS2K clones *C. arabica* L. transformant plantlet genome in the presence of amplified DNA fragment bands of the *AtRKD4* gene of 382 bp, the *HPT* gene of 545 bp and the *Actin* gene of 114 bp on gel electrophoresis. In the non-transformant plantlet samples, there was no *AtRKD4* gene band of 382 bp, *HPT* gene with the size of 545 bp, but there was an *Actin* gene band with a size of 114 bp on the electrophoresis gel. The frequency of genetic transformation mediated *Agrobacterium tumefaciens* carrying T-DNA with the 35S::*GR*::*AtRKD4* construction in AS2K clones *C. arabica* L. was 1.52%.

The expression of the *AtRKD4* was successful to initiate the formation of somatic embryos directly without callus formation in AS2K clones *C. arabica* L. The induction of somatic embryos using leaf explants of transformant plantlets showed the ability to induce somatic embryos faster than non-transformant plantlets with a higher percentages of somatic embryo formation than non-transformant plantlet leaf explants. Somatic embryo formation, somatic embryo germination and plantlet regeneration in transformant plantlets showed the same phenotype as non-transformant plantlets of AS2K clones *C. arabica* L. The transgene expressions of the *AtRKD4*, *HPT* and *Actin* in AS2K clones *C. arabica* L. transformant plantlets induced with 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP produced 382 bp, 545 bp and 114 bp amplicons. However, it was not detected in non-transformant plantlets leaf explants. *Actin* was expressed in all plantlet samples. The expression of the *AtRKD4* transgene at the translation level was identified by the formation of proteins with molecular weights of 28.54 kDa and 28.78 kDa in AS2K clones *C. arabica* L. carrying 35S::*GR*::*AtRKD4* after being treated with 1 mg/L 2,4-D and 1 mg/L BAP for 7 days.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *AtRKD4*, auxin, *C. arabica* L, cytokinin, somatic embryogenesis