

JURNAL METAMORFOSA

Journal of Biological Sciences

ISSN: 2302-5697

<http://ejournal3.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

Optimasi Sterilisasi Eksplan Daun Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Asal Sidikalang untuk Penanaman *In Vitro*

Optimization of Sterilization for Leaf Explants of Robusta Coffee (*Coffea canephora*) from Sidikalang for *In Vitro*

Yuni Artha Rapima Simbolon¹, Fauziah Harahap², Sthevy Graf Malau³, Dear Chio Sembiring⁴, Wilda Khairani⁵, Udur Astiona Sitanggang⁶, Santaro Marito Nadeak⁷

^{1,2,3,4,5,6,7}Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Medan, Medan

*Email: fauziahharahap@unimed.ac.id

INTISARI

Kopi Sidikalang, Sumatera Utara, merupakan salah satu kopi spesialti Indonesia. Namun, produksi kopi ini mengalami stagnasi akibat keterbatasan bibit unggul. Kultur jaringan menjadi solusi potensial untuk memperbanyak bibit kopi Robusta secara cepat dan seragam. Tetapi keberhasilan teknik ini sangat bergantung pada tahapan sterilisasi eksplan yang tepat guna mencegah kontaminasi tanpa merusak eksplan. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh dan pola sterilisasi paling optimal untuk eksplan daun kopi Robusta asal Sidikalang. Desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan enam perlakuan dan 15 ulangan. Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji *Kruskal Wallis* kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Hasil penelitian menunjukkan terdapat pengaruh nyata pola sterilisasi terhadap hari eksplan terkontaminasi, persentase kontaminasi, *browning*, dan eksplan berkalus, namun tidak berpengaruh nyata terhadap hari munculnya kalus. Pola sterilisasi 5 terbukti paling optimal, dengan hasil kontaminasi terendah (6,6%), tanpa *browning* (0%), dan kalus tertinggi (93,3%). Pola sterilisasi 5 meliputi pencucian dengan detergen, perendaman agrept (30 menit), benlate (30 menit), diikuti sterilisasi dalam LAFC menggunakan tween 20 (5 menit), bayclin bertingkat 10%, 20% dan 30% (selama 15, 10, dan 5 menit), alkohol 70% (10 detik), dan asam askorbat (25 menit).

Kata kunci : Kalus, kontaminasi, kopi robusta, kultur jaringan, sterilisasi.

ABSTRACT

Sidikalang coffee from North Sumatra is one of Indonesia's specialty coffees. However, its production has stagnated due to the limited availability of superior planting material. Tissue culture offers a potential solution for the rapid and uniform propagation of Robusta coffee seedlings. The success of this technique depends on how well the explants are sterilized. Sterilization is important to prevent contamination without damaging the explants. This study aimed to determine the most effective sterilization method for leaf explants of Robusta coffee from Sidikalang. The experiment used a Completely Randomized Design (CRD) with six treatments and 15 replications. Data were analyzed using the *Kruskal Wallis* test, followed by the *Mann Whitney*. Results showed that sterilization treatments significantly affected contamination time, contamination percentage, *browning*, and percentage of callus-forming explants, but not callus emergence time. Treatment P5 was the most

optimal, yielding the lowest contamination rate (6.6%), no browning (0%), and the highest callus formation (93.3%). This protocol involved washing with detergent, soaking in Agrept (30 minutes) and Benlate (30 minutes), followed by sterilization in a laminar airflow cabinet using Tween 20 (5 minutes), sequential immersion in 10%, 20%, and 30% bleach (for 15, 10, and 5 minutes respectively), 70% ethanol (10 seconds), and ascorbic acid (25 minutes).

Keyword: *Callus, contamination, coffee robusta, tissue culture, sterilization.*

PENDAHULUAN

Indonesia adalah produsen kopi (*Coffea green*) ketiga terbesar dunia setelah Brazil dan Vietnam, dengan luas areal perkebunan mencapai 1,2 juta ha per tahun 2023. Buah kopi memiliki peran vital sebagai sumber devisa Negara karena bernilai ekspor tinggi (komoditi unggulan) mencapai US\$ 815,93 juta-1.197,74 juta setara 12-18 triliun rupiah. Dua jenis kopi terpenting dalam perdagangan kopi dunia ialah kopi Arabika (*Coffea arabica*) dan kopi Robusta (*Coffea canephora*). Untuk Indonesia sendiri, diketahui 87% dari total produksi kopi merupakan kopi Robusta sedangkan 13% sisanya merupakan kopi Arabika (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023; Priantari & Dharmawan, 2022; Direktorat Statistik Tanaman Pangan, Hortikultura, dan Perkebunan, 2024).

Kopi Sidikalang adalah kopi spesialti asal Dairi, Sumatera Utara. Kopi spesialti diartikan sebagai kopi yang tumbuh pada iklim mikogeografis khusus, mempunyai cita rasa yang khas serta unik yang menjadikannya dikenal di kalangan masyarakat (Silaban *et al.*, 2023). Kopi Sidikalang memiliki harga jual yang cukup tinggi dengan rata-rata mencapai Rp. 40.000/kg biji hasil pengolahan kering. Kopi Sidikalang memiliki karakteristik unik yakni beraroma lembut mirip coklat dan rasa manis yang seimbang dengan pahit (Meliala & Taufiq, 2024).

Menurut Sinaga *et al.* (2024) produksi kopi di Kecamatan Sidikalang dalam beberapa tahun terakhir relatif stagnan, salah satunya disebabkan oleh keterbatasan akses bibit kopi unggul. Kondisi ini diperburuk oleh kopi Robusta yang merupakan tanaman penyerbuk silang (*Allogamous*) dan bersifat *self-incompatible*, sehingga bibit yang dihasilkan dari biji sangat bervariasi dan sering kali memiliki hasil panen rendah (Hapsoro *et al.*, 2019).

Salah satu cara terbaik untuk memperoleh sumber bibit berkualitas ialah dengan kultur jaringan. Kultur jaringan memungkinkan perbanyakan bibit dalam jumlah besar, identik dengan induknya (*true to type*) dalam waktu yang lebih singkat (Rismayanti & Nafi'ah, 2021; Chika *et al.*, 2022). Keunggulan perbanyakan melalui kultur jaringan dibandingkan konvensional meliputi ketersediaan bibit yang lebih terjamin, bibit terstandarisasi, daya multiplikasi tinggi, serta tidak dipengaruhi musim (Supriadi *et al.*, 2018; Harahap *et al.*, 2023).

Faktor penting dalam keberhasilan kultur jaringan adalah sterilisasi eksplan sebelum ditanam agar terbebas dari kontaminasi. Kontaminasi merupakan faktor dominan yang mempengaruhi keberhasilan dalam kultur jaringan terutama pada eksplan (Harahap *et al.*, 2023; Fitriani *et al.*, 2019). Mikroba yang tumbuh lebih cepat dan mendominasi eksplan dapat menyebabkan persaingan nutrisi di dalam media, mengurangi ketersediaan oksigen dan akhirnya meningkatkan resiko kematian tanaman kultur (Pratiwi *et al.*, 2021).

Tingkat kontaminasi setiap bahan eksplan yang digunakan dalam perbanyakan *in vitro* berbeda. Keadaan ini dipengaruhi oleh jenis tanaman, bagian tanaman, morfologi permukaan, lingkungan tumbuh dan kondisi tanaman (Abdullah *et al.*, 2022). Sterilisasi permukaan eksplan pada perbanyakan kultur jaringan menunjukkan perbedaan teknik pada setiap jenis, dengan kombinasi jenis sterilan maupun waktu sterilisasi, sehingga memerlukan penelitian individual spesies untuk protokol kultur jaringan (Meidina *et al.*, 2018). Lebih lanjut sterilisasi permukaan bertujuan untuk menghilangkan atau membunuh kontaminan tanpa mempengaruhi aktivitas biologis eksplan, menjadikannya langkah paling krusial dalam kultur jaringan tanaman. Dengan protokol sterilisasi yang dioptimalkan, tingkat keberhasilan kultur jaringan dapat meningkat secara signifikan (Hutabarat *et al.*, 2022).

Optimasi sterilisasi telah dilaporkan pada penelitian Chika *et al.* (2022), Asmono *et al.* (2022) dan Agustiningrum *et al.* (2023), dimana secara bersama menunjukkan bahwa sterilisasi yang dioptimalkan efektif untuk mengurangi kontaminasi, *browning* hingga eksplan hidup yang pada akhirnya meningkatkan keberhasilan kultur eksplan. Tidak semua mikroorganisme dapat disterilkan dengan satu metode saja, hal ini menjadi dasar mencari pola sterilisasi yang optimal untuk eksplan lapang daun kopi Robusta asal Sidikalang, guna menekan kontaminasi yang pada akhirnya meningkatkan pertumbuhan eksplan sebagai bibit unggul.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan YAHDI, Jalan Lambung, Lingkungan VII, Tanah 600, Medan Marelan, Kota Medan, Sumatera Utara, pada Maret hingga Juni 2025.

Persiapan Eksplan

Tanaman kopi diperoleh dari Desa Gundaling, Kec. Gunung Sitember, Kab. Dairi, Sumatera Utara. Tanaman kopi yang digunakan berciri sehat bebas penyakit, berumur 5-7 bulan. Eksplan berupa daun muda, berukuran 7-12 cm, berada pada urutan kedua hingga ketiga dari pucuk.

Desain Penelitian

Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) non faktorial dengan enam perlakuan yang diulang 15 kali. Pengamatan dilakukan hingga hari ke 30 setelah tanam (HST). Media tanam yang digunakan adalah media $\frac{1}{2}$ MS (*Murashige and Skoog*) dengan penambahan 1 ppm 2,4-D dan 2 ppm kinetin.

Sterilisasi Eksplan dan Penanaman

Pola sterilisasi pada penelitian ini disusun dengan mempertimbangkan efektivitas dalam menghilangkan kontaminan tanpa merusak eksplan. Rincian pola sterilisasi disajikan pada Tabel 1. Eksplan yang telah melalui proses sterilisasi dipotong menjadi ± 1 cm² dan ditanam secara *adaxial faces on medium* (permukaan atas daun menyentuh media). Setiap botol kultur diberi satu potong eksplan.

Pengamatan

Hari eksplan terkontaminasi

Lama hari sejak eksplan ditanam hingga kontaminan pertama kali muncul.

Persentase eksplan terkontaminasi

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah eksplan yang mengalami kontaminasi jamur dan bakteri sejak satu minggu setelah tanam (MST). Kontaminasi bakteri diamati secara visual ditandai dengan terbentuknya koloni dengan selaput bening (berlendir) dan lambat laun berubah menjadi putih kekuningan. Sementara kontaminasi jamur ditandai dengan kumpulan spora (berbulu) berwarna putih atau coklat (Shofiyani *et al.*, 2020).

$$\% \text{ kontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{Total eksplan}} \times 100\%$$

Persentase eksplan *browning*

Persentase *browning* ditentukan berdasarkan perubahan warna eksplan hingga media menjadi coklat. Pengamatan dilakukan per minggu setelah tanam (MST).

$$\% \text{ browning} = \frac{\text{Jumlah eksplan browning}}{\text{Total eksplan}} \times 100\%$$

Hari munculnya kalus

Lama waktu sejak eksplan ditanam hingga kalus pertama kali muncul.

Persentase eksplan berkalus

Pengamatan dilakukan per minggu setelah tanam (MST).

$$\% \text{ eksplan berkalus} = \frac{\text{Jumlah eksplan berkalus}}{\text{Total eksplan}} \times 100\%$$

Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan uji nonparametrik *Kruskal Wallis* 5% dan apabila terdapat pengaruh, dilakukan uji lanjut untuk melihat perbedaan antar pola sterilisasi menggunakan uji *Mann Whitney* 5%.

Tabel 1. Pola sterilisasi pada eksplan daun kopi Robusta asal Sidikalang

Pola Sterilisasi	Perawatan	Bahan Sterilisasi (Perlakuan)	Konsentrasi	Durasi	Pola Sterilisasi
Pola sterilisasi 1 (P1)	Di luar LAFC	Detergen cair	2 mL/L	10 menit	Pola sterilisasi 1 (P1)
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Carbendazim 80 WP	2 g/L	30 menit	
		Agrimycin 15/1,5 WP	2 g/L	20 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
	Di dalam LAFC	Alkohol	70%	3 detik	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Bayclin (NaOCl	10%	10 menit	
		Bayclin	20%	10 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
Pola sterilisasi 2 (P2)	Di luar LAFC	Dicuci 3x dengan detergen cair	-	-	Pola sterilisasi 2 (P2)
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Agrept 20 WP	2 g/L	20 menit	
		Mancozeb 80 WP	2 g/L	20 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
	Di dalam LAFC	Tween 20	3 tetes/100mL	10 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Bayclin	20%	20 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Alkohol	70%	1 menit	
Pola sterilisasi 3 (P3)	Di luar LAFC	Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	Pola sterilisasi 3 (P3)
		Di cuci dibawah air mengalir	-	-	
		Detergen cair	2 g/L	15 menit	
		Bactomycin 15/5 WP	2 g/L	15 menit	
		Benlate 50 WP	2 g/L	15 menit	
	Di dalam	Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Bayclin 20% + Tween 20	-	20 menit	

	L AFC	(3 tetes/100mL) *digoyangkan			
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Alkohol 70%		30 detik	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Asam askorbat 100mg/100mL		15 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
Pola sterilisasi 4 (P4)	Di luar L AFC	Dicuci 3x dengan detergen cair	-	-	Pola sterilisasi 4 (P4)
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Agrimycin 15/1,5 WP + Tween 20 (5 tetes)	2 g/L	25 menit	
		Carbendazim 80 WP	2 g/L	25 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
	Di dalam L AFC	Bayclin 10%		10 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Bayclin 20%		10 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Alkohol 70%		15 detik	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Asam askorbat 200mg/100mL		20 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
Pola sterilisasi 5 (P5)	Di luar L AFC	Dicuci 3x dengan detergen cair	-	-	Pola sterilisasi 5 (P5)
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Agrept 20 WP	2 g/L	30 menit	
		Benlate 50 WP	2 g/L	30 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
	Di dalam L AFC	Tween 20 3 tetes/100mL		5 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Bayclin 10%		15 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Bayclin 20%		10 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Bayclin 30%		5 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
		Alkohol 70%		10 detik	
		Asam askorbat 300mg/100mL		25 menit	
		Bilas 3x dengan akuades steril	-	-	
Pola sterilisasi 6 (P6)	Di luar L AFC	Dicuci 3x dengan detergen cair	-	-	Pola sterilisasi 6 (P6)
		Bilas 3x dengan akuades	-	-	

Di dalam LAFC	steril		
	Bactomycin 15/5 WP + 2 g/L		1 jam
	Mancozeb 80 WP		
	Bilas 3x dengan akuades	-	-
	steril		
	Tween 20 (3 - tetes/100mL)+Bayclin 20%		15 menit
	Bilas 3x dengan akuades	-	-
	steril		
	Alkohol 70%		5 detik
	Bilas 3x dengan akuades	-	-
	steril		
	Asam askorbat 400mg/100mL		15 menit
	Bilas 3x dengan akuades	-	-

Catatan : konsentrasi bayclin dinyatakan sebagai v/v (volume/volume) dari larutan induk. Larutan induk bayclin mengandung 0,25% NaOCl, sehingga penggunaan bayclin 10%, 20%, dan 30% (v/v) masing-masing setara dengan 0,025%, 0,05%, dan 0,075% NaOCl aktif

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hari Eksplan Terkontaminasi

Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* 5% diperoleh adanya pengaruh nyata pola sterilisasi terhadap hari eksplan terkontaminasi (Tabel 2), sehingga dapat dilakukan uji lanjut. Hasil uji lanjut *Mann Whitney* 5% menunjukkan bahwa hari eksplan terkontaminasi berbeda nyata pada P1 dan P5 serta P2 dan P5 (Tabel 3).

Tabel 2. Hasil uji *Kruskal Wallis* hari eksplan terkontaminasi

<i>Kruskal Wallis</i> H	Derajat Bebas (db)	Signifikansi
12,127	5	0,033

Tabel 3. Hasil uji *Mann Whitney* hari eksplan terkontaminasi

Perlakuan	Rerata
Pola 1 (P1)	6,2 ± 7,29 ^a
Pola 2 (P2)	5,7 ± 8,96 ^{ac}
Pola 3 (P3)	2,8 ± 6,37 ^{abc}
Pola 4 (P4)	9,06 ± 10,7 ^{abc}
Pola 5 (P5)	0,4 ± 1,54 ^b
Pola 6 (P6)	8,2 ± 9,1 ^{abc}

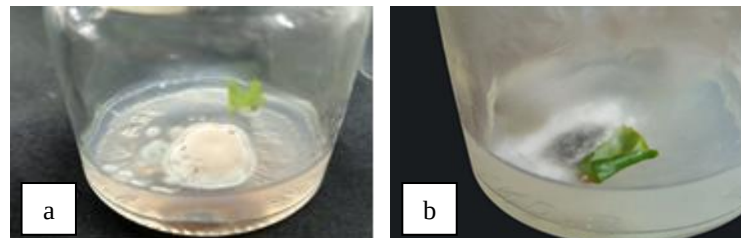
Keterangan : angka yang diikuti dengan notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

Berdasarkan hasil penelitian, P5 menunjukkan waktu rata-rata terkontaminasi tercepat yakni 0,4 hari dan terlama pada P4 yaitu 9,06 hari (Tabel 3). Walaupun waktu eksplan terkontaminasi pada P5 adalah yang tercepat namun tingkat persentase kontaminasinya jauh lebih rendah yaitu 6,6% dibandingkan P4 sebesar 46,6% (Tabel 6). Tujuan utama dari sterilisasi permukaan adalah untuk menekan kontaminasi mikroba tanpa merusak eksplan (Harahap *et al.*, 2023). Dengan demikian, semakin rendah persentase kontaminasi, semakin efektif pola sterilisasi tersebut. Protokol sterilisasi yang efektif harus lebih mengutamakan rendahnya tingkat kontaminasi, meskipun dalam beberapa kasus hari munculnya kontaminasi mungkin lebih cepat. Selanjutnya, eksplan yang mengalami kontaminasi tetap dianggap gagal, terlepas dari rentang hari munculnya kontaminasi pada eksplan. Oleh karena itu, kendati P4 menunjukkan hari eksplan terkontaminasi yang lebih lama, hal ini tidak mengindikasikan keberhasilan apabila hampir setengah eksplan uji tetap terkontaminasi.

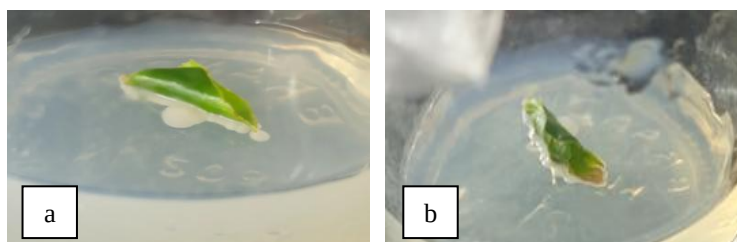
Hasil pengamatan menunjukkan bahwa hari eksplan terkontaminasi bervariasi pada setiap perlakuan pola sterilisasi (Tabel 3). Berdasarkan variasi waktu tersebut, sumber kontaminasi dibagi menjadi dua kelompok yakni kontaminasi eksternal yang muncul kurang dari tujuh hari setelah tanam dan kontaminasi internal yang muncul lebih dari tujuh hari setelah tanam (Agustiningrum *et al.*, 2023). Kontaminasi eksternal umumnya disebabkan oleh alat atau bahan yang tidak steril, serangga kecil yang masuk ke dalam botol kultur, atau paparan udara. Sementara itu, kontaminasi internal bersumber dari mikroba endogen yang berada di dalam jaringan tanaman. Kontaminasi internal terjadi akibat zat hara dalam media banyak diserap oleh eksplan, kemudian memicu bakteri dalam jaringan keluar dan berkembang pada media (Handayani *et al.*, 2022). Keberadaan mikroba endogen dilaporkan oleh Harahap *et al.* (2015) dalam penelitian sterilisasi eksplan nanas Sipahutar. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa walaupun eksplan awalnya steril, kontaminasi masih tetap terjadi setelah 40 HST, yang ditandai dengan keluarnya lendir dari jaringan eksplan.

Sumber kontaminasi dalam penelitian ini didominasi oleh jamur dengan ciri berwarna putih dan abu-abu, permukaan berbulu, kasar, serta timbul ke permukaan (Gambar 1). Menurut Handayani *et al.*, (2022) dominasi jamur disebabkan oleh intensnya kontak antara daun dengan udara selama masa pemeliharaan yang mana dapat mengandung spora jamur. Jenis jamur yang biasanya muncul dalam kultur jaringan yaitu *Mucor* dan *Rhizopus* dari kelompok *Zygomycetes*, dengan ciri hifa seperti benang putih hingga kehitaman, dan tampak sporangiumnya pada eksplan. Hal serupa juga dilaporkan dalam penelitian Andriani & Heriansyah (2021) yang menunjukkan adanya kontaminasi jamur pada kultur *in vitro* yang didominasi oleh kelas *Deuteromycetes* dan *Zygomycetes* dengan ciri-ciri warna koloni putih serta ada juga yang berwarna abu-abu dengan tekstur permukaan kasar.

Pada penelitian, keberadaan kontaminasi bakteri juga terlihat dimana memiliki ciri koloni dengan permukaan mengkilat, berair, serta tampak licin (Gambar 2). Jenis bakteri yang biasanya menjadi penyebab kontaminasi kultur jaringan yaitu dari kelas *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, dan *Staphylococcus* dengan ciri lendir putih hingga kekuningan di permukaan media sehingga membuat kondisi sekitarnya terlihat lebih basah karena adanya lendir (Handayani *et al.*, 2022).



Gambar 1. Eksplan terkontaminasi jamur. (a) kontaminasi jamur pada eksplan P1 (10 HST), ditandai dengan timbulnya koloni berbentuk bulat, berwarna putih dengan lingkaran abu-abu, bertekstur berbulu, serta terdapat titik hitam yang diduga sporangium; (b) kontaminasi jamur pada eksplan P4 (14 HST), dengan ciri koloni berwarna putih tebal menyerupai kapas, berbentuk tidak beraturan, menyebar, dan disertai titik hitam yang diduga sporangium (Sumber : dokumentasi pribadi, 2025)



Gambar 2. Eksplan Terkontaminasi Bakteri. (a) kontaminasi bakteri pada eksplan P3 (7 HST) dan; (b) eksplan P6 (6 HST) dengan ciri serupa yakni berwarna putih, permukaan mengkilat, berair, serta tampak licin (Sumber : dokumentasi pribadi, 2025)

Persentase Eksplan Terkontaminasi

Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* 5% diperoleh adanya pengaruh nyata pola sterilisasi terhadap persentase eksplan terkontaminasi (Tabel 4), sehingga dapat dilakukan uji lanjut. Hasil uji lanjut *Mann Whitney* 5% menunjukkan bahwa persentase kontaminasi berbeda nyata pada P1 dan P5, P4 dan P5 serta P5 dan P6 (Tabel 5). Selanjutnya berdasarkan Tabel 6 terlihat diantara P1, P4, P5 dan P6 yang menghasilkan persentase eksplan terkontaminasi paling rendah ialah P5, sebesar 6,6%. Sementara persentase kontaminasi tertinggi diperoleh dari P1 dan P6 senilai 53,3%.

Tabel 4. Hasil uji *Kruskal Wallis* persentase eksplan terkontaminasi

<i>Kruskal Wallis</i> H	Derajat Bebas (db)	Signifikansi
11,892	5	0,036

Tabel 5. Hasil uji *Mann Whitney* persentase eksplan terkontaminasi

Perlakuan	Rerata
Pola 1 (P1)	0,53 ± 0,51 ^a
Pola 2 (P2)	0,33 ± 0,48 ^{abc}
Pola 3 (P3)	0,20 ± 0,41 ^{abc}
Pola 4 (P4)	0,46 ± 0,51 ^{ab}
Pola 5 (P5)	0,06 ± 0,25 ^c
Pola 6 (P6)	0,53 ± 0,51 ^{ab}

Keterangan : angka yang diikuti dengan notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

Tabel 6. Persentase eksplan terkontaminasi

Pola Sterilisasi	Persentase
Pola 1 (P1)	53,3%
Pola 2 (P2)	33,3%
Pola 3 (P3)	20%
Pola 4 (P4)	46,6%
Pola 5 (P5)	6,6%
Pola 6 (P6)	53,3%

Kontaminasi terjadi ketika lingkungan kultur terganggu akibat masuknya mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. Sumber utama kontaminasi salah satunya berasal dari eksplan tanaman itu sendiri akibat keberadaan mikroba endogen. Eksplan daun lebih rentan mengalami kontaminasi karena adanya stomata dan permukaan epidermis yang memungkinkan masuknya jamur maupun bakteri, yang kemudian tumbuh dan berkembang di dalam jaringan daun (Heriansyah & Indrawanis, 2020).

Pola 5 merupakan pola paling optimal dalam menekan persentase kontaminasi eksplan dalam penelitian ini. Bahan sterilan yang digunakan pada P5 mencakup detergen cair, agrept, benlate, tween 20, bayclin bertingkat (10%, 20%, dan 30%), alkohol 70% dan asam askorbat. Penggunaan bakterisida agrept dan agrimycin terlihat cenderung lebih baik dalam menekan kontaminasi bakteri dibandingkan bakterisida bactomycin. Berdasarkan hasil pengamatan secara bersama penggunaan agrept dan agrymicin dapat menekan kontaminasi bakteri 100%. Terlihat pada P2 dan P5 serta P1 dan P4, yang secara bersama tidak ditemui koloni bakteri pada eksplan yang terkontaminasi. Agrept merupakan bakterisida berbahan aktif streptomisin sulfat 20% yang bersifat racun bagi bakteri. Penggunaan agrept telah dilaporkan pada penelitian Asmono *et al.* (2021), yakni secara bersama pola sterilisasi yang menggunakan bakterisida agrept menghasilkan kontaminasi bakteri 0% pada eksplan daun kopi Arabika Andungsari. Diketahui bakterisida agrept banyak digunakan dalam mengendalikan penyakit layu bakteri, terutama penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia solanacearum*. Penyakit layu merupakan salah satu kendala utama dalam budi daya kopi (Sanjaya *et al.*, 2016). Hal tersebut mendukung penggunaan agrept sebagai bakterisida yang lebih baik bagi eksplan daun kopi Robusta

asal Sidikalang dimana diharapkan mampu membunuh bakteri penyebab penyakit layu yang mungkin hidup pada permukaan daun yang besar peluangnya sebagai sumber kontaminasi.

Agrimycin mengandung streptomisin sulfat 15% dan oksitetrasiklin 1,5%. Penggunaan agrimycin telah dilaporkan pada penelitian Asmono *et al.* (2022), dimana pola sterilisasi yang menyertakan bakterisida agrimycin menunjukkan kontaminasi bakteri 0% dan 5% pada eksplan daun kopi Robusta BP 308. Bactomycin mengandung streptomisin sulfat 15% dan oksitetrasiklin 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan bactomycin secara bersama menghasilkan kontaminasi bakteri pada P3 dan P6, yakni ditemukannya koloni bakteri berciri putih, mengkilat serta berair, muncul pada 7 HST untuk P3 dan 6 HST untuk P6.

Penggunaan fungisida benlate terlihat cenderung lebih baik dalam menekan kontaminasi jamur yang merupakan kontaminan dominan dalam pertumbuhan *in vitro* eksplan daun kopi Robusta asal Sidikalang dibandingkan fungisida lainnya. Ini terlihat dari P3 yang juga menggunakan fungisida benlate dan direndam selama 15 menit, sementara P5 direndam benlate selama 30 menit. Perlakuan P3 menunjukkan persentase kontaminasi sebesar 20%, yang merupakan nilai kedua terendah setelah P5. Benlate adalah fungisida berbahan aktif benomil 50%. Benomil merupakan fungisida sistemik golongan *benzimidazole* yang memiliki spektrum luas. Penelitian oleh Maharani *et al.* (2022) melaporkan perendaman eksplan ruas batang *Citrus reticulata* var. Tawangmangu dalam fungisida benstar yang berbahan aktif benomil 50% dengan dosis 0,4%g/150mL selama 40 menit, menghasilkan persentase eksplan hidup tanpa adanya kontaminasi. Benomil 50% juga memiliki spektrum luas terhadap jamur dari kelas *Basidiomycetes*, *Ascomycetes*, dan *Deuteromycetes* (Surya & Ismaini, 2021). Benomil bekerja dengan menghambat pembentukan mikrotubulus pada jamur tanpa merusak mikrotubulus tanaman. Selain itu, benomil bersifat eradikan, yaitu mampu menghentikan pertumbuhan miselium baik sebelum maupun sesudah infeksi terjadi (Maharani *et al.*, 2022).

Penggunaan *tween* 20 berperan sebagai zat pembasah, peningkat kelarutan dan emulgator. Larutan *Tween* 20 digunakan dengan tujuan membuka jaringan daun sehingga bahan sterilan dapat dengan mudah masuk ke dalam jaringan daun (Arimarsetiowati, 2019). Alkohol merupakan senyawa kimia yang memiliki gugus -OH. Larutan alkohol 70% efektif menekan kontaminasi dari jamur dan bakteri. Alkohol bekerja sebagai agen antimikroba dengan mendenaturasi protein dan menghambat metabolisme sel. Pada konsentrasi 100%, alkohol menyebabkan koagulasi protein di permukaan sel secara cepat, membentuk lapisan pelindung yang menghambat penetrasi lebih lanjut, sehingga sel tidak mati sepenuhnya. Sebaliknya, alkohol 70% lebih efektif karena air membantu penetrasi alkohol ke dalam sel dan memperlambat penguapan, memungkinkan denaturasi protein secara menyeluruh dan menyebabkan kematian sel total (Saha *et al.*, 2022).

Bayclin merupakan zat pemutih yang mengandung 0,25% NaOCl. NaOCl adalah senyawa kimia yang lumrah digunakan dalam kultur jaringan. Diketahui NaOCl mampu membunuh berbagai macam jamur, bakteri, dan virus. NaOCl berfungsi untuk mencegah kontaminasi bakteri, baik endogen dan eksogen. Hasil pengamatan P5 menunjukkan tidak adanya kontaminasi internal (>7 HST) yang mana mengindikasikan bahwa P5 mampu menekan kontaminasi internal akibat mikroorganisme endogen. Hal ini diduga akibat dilakukannya sterilisasi bertingkat yakni perendaman bayclin 10%, bayclin 20%, serta bayclin 30% secara berturut-turut. NaOCl dengan konsentrasi dan waktu perendaman yang terlalu rendah kurang efektif dalam menghambat timbulnya kontaminasi pada eksplan (Chika *et al.*, 2022).

Penelitian Chika *et al.* (2022) melaporkan bahwa sterilisasi bertingkat adalah metode sterilisasi yang paling efektif untuk mengurangi kontaminasi dan *browning* pada kultur *in vitro* tunas *Castanopsis argentea* yakni sebesar 20%. Kadar NaOCl 10%, NaOCl 20%, dan NaOCl 30% lebih rentan terhadap kontaminasi jika dibandingkan dengan sterilisasi NaOCl bertingkat. Pada sterilisasi bertingkat, eksplan secara bertahap direndam dalam kadar NaOCl 10%, NaOCl 20% dan NaOCl 30% secara berturut-turut.

Penggunaan asam askorbat dalam penelitian ini diharapkan dapat menurunkan *browning* pada eksplan. Kendala yang sering muncul dalam kultur tanaman berkayu yaitu adanya senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan tanaman bersifat racun pada media tanam sehingga mengganggu pertumbuhan

dan perkembangan kultur (Guntur *et al.*, 2019). Salah satu upaya mengatasi *browning* pada kultur tanaman dapat dilakukan dengan penambahan senyawa antioksidan seperti asam askorbat (Admojo & Prasetyo, 2018). Perendaman dengan asam askorbat bertujuan untuk mengurangi reaksi antara enzim polifenolase, oksigen, dan senyawa polifenol yang bertanggung jawab dalam proses terjadinya *browning* (Sugiari *et al.*, 2020).

Asam askorbat mampu menetralkan zat bernama *o-quinon* (senyawa fenolik yang dihasilkan oleh enzim polifenol oksidase (PPO), yang biasanya terbentuk saat tanaman rusak dan menyebabkan warna cokelat pada eksplan. Asam askorbat memiliki dua bagian penting (gugus hidroksil di C2 dan C3) yang bisa mereduksi *o-quinon*, dimana dapat mengubah *o-quinon* kembali ke bentuk awal sebelum berubah warna menjadi coklat. Proses ini berlangsung cepat dan mencegah terbentuknya polimer *o-quinon*, yaitu senyawa-senyawa berwarna cokelat. Selain itu, asam askorbat bisa bereaksi dengan oksigen di udara. Saat ini terjadi, oksigen digunakan untuk mengoksidasi asam askorbat menjadi asam dehidroaskorbat dan hidrogen peroksida. Reaksi antara oksigen dan asam askorbat menyebabkan oksigen tidak bisa lagi mengoksidasi *o-difenol*, senyawa yang biasanya berubah menjadi *o-quinon* (Chika *et al.*, 2022).

Persentase Eksplan *Browning*

Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* 5% diperoleh adanya pengaruh nyata pola sterilisasi terhadap persentase eksplan *browning* (Tabel 7), sehingga dapat dilakukan uji lanjut. Hasil uji lanjut *Mann Whitney* 5% menunjukkan bahwa persentase *browning* berbeda nyata pada P1 dan P3, P1 dan P4, P1 dan P5, P1 dan P6, P2 dan P3, P2 dan P4, P2 dan P5 serta P2 dan P6 (Tabel 8).

Tabel 7. Hasil uji *Kruskal Wallis* persentase eksplan *browning*

<i>Kruskal Wallis</i> H	Derajat Bebas (db)	Signifikansi
28,526	5	< 0,001

Tabel 8. Hasil uji *Mann Whitney* persentase eksplan *browning*

Perlakuan	Rerata
Pola 1 (P1)	0,46 ± 0,51 ^a
Pola 2 (P2)	0,33 ± 0,48 ^a
Pola 3 (P3)	0,00 ± 0,00 ^b
Pola 4 (P4)	0,00 ± 0,00 ^b
Pola 5 (P5)	0,00 ± 0,00 ^b
Pola 6 (P6)	0,00 ± 0,00 ^b

Keterangan : angka yang diikuti dengan notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

Tabel 9. Persentase eksplan *browning*

Pola Sterilisasi	Persentase
Pola 1 (P1)	46,6%
Pola 2 (P2)	33,3%
Pola 3 (P3)	0%
Pola 4 (P4)	0%
Pola 5 (P5)	0%
Pola 6 (P6)	0%

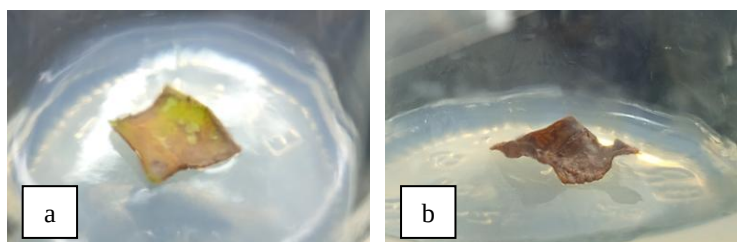
Browning adalah kondisi dimana eksplan mengalami perubahan warna menjadi coklat atau hitam, yang akhirnya menghambat pertumbuhan dan perkembangan bahkan dapat berujung pada kematian eksplan. *Browning* juga dapat menyebabkan media menjadi berwarna coklat. Munculnya *browning* diawali pada bagian eksplan yang dipotong, eksplan menunjukkan perubahan warna dari hijau menjadi

coklat selanjutnya berubah menjadi kehitaman (Helena *et al.*, 2022). *Browning* merupakan respons adaptif terhadap pengaruh fisik dan biokimia (Harahap *et al.*, 2015). Tampak eksplan *browning* dalam penelitian ini terlihat pada Gambar 3.

Terlihat diantara P1, P2, P3, P4, P5 dan P6 yang menghasilkan persentase eksplan *browning* tertinggi ialah P1 sebesar 46,6%, lalu disusul P2 sebesar 33,3%. Sementara P3, P4, P5 dan P6 secara bersama menghasilkan persentase *browning* 0%. Perbedaan persentase *browning* antar pola sterilisasi diduga disebabkan oleh perendaman dengan asam askorbat. Pada P1 dan P2 terlihat eksplan mengalami *browning* sementara pada P3 hingga P6 yang dilakukan perendaman asam askorbat tidak mengalami *browning* pada eksplannya.

Fenomena *browning* dijelaskan dalam Admojo & Prasetyo (2018), umumnya disebabkan oleh akumulasi senyawa fenolik yang muncul saat eksplan mengalami luka, yang dipicu oleh aktivasi enzim polifenol oksidase (PPO). Karena itu, asam askorbat berperan menetralkan zat bernama *o-quinon* (senyawa fenolik yang dihasilkan oleh enzim PPO), yang biasanya terbentuk saat tanaman rusak dan menyebabkan warna coklat (Chika *et al.*, 2022). Selanjutnya, *browning* juga dapat disebabkan oleh radikal oksigen bebas selama proses respirasi. Radikal bebas dapat menyebabkan dekompartemenisasi (rusaknya vakuola dan plastida), yang memicu aktivasi enzim PPO. Enzim PPO pada akhirnya mengoksidasi senyawa fenolik menjadi *o-quinon* dan menghasilkan pigmen coklat. Pemberian senyawa antioksidan seperti asam askorbat berperan penting dalam menghambat proses tersebut. Asam askorbat mampu menangkap radikal oksigen bebas, sehingga mencegah kerusakan membran sel dan aktivasi PPO. Selain itu, asam askorbat juga dapat mereduksi radikal *tocopheryl* menjadi semi-dehidroaskorbat, tanpa menghasilkan hidrogen peroksida, yaitu senyawa reaktif yang bersifat toksik bagi sel (Admojo & Indrianto, 2016).

Penelitian oleh Admojo & Prasetyo (2018) menggunakan eksplan daun karet (*Hevea brasiliensis*) membuktikan bahwa perendaman dalam larutan steril asam askorbat 100 mg/L selama 30 menit yang diinkubasi dalam ruang gelap mampu menghasilkan intensitas *browning* 7,5%, serta persentase eksplan *browning* sebesar 30% . Kemudian, pada penelitian Sugiari *et al.* (2020) menggunakan eksplan tunas rasberi hitam (*Rubus occidentalis* L.) menyatakan perendaman eksplan dalam vitamin c (asam askorbat) steril sebanyak 100 ppm menghasilkan eksplan *browning* 0%.



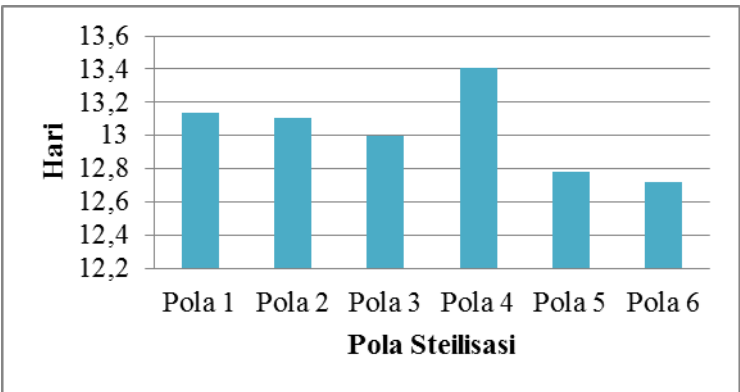
Gambar 3. Eksplan *browning*. (a) eksplan pada P1 menunjukkan gejala *browning* (9 HST), ditandai dengan munculnya bercak-bercak berwarna coklat, namun sebagian jaringan masih tampak berwarna hijau; (b) eksplan pada P1 seluruhnya *browning* (23 HST), yang ditandai dengan tidak ditemukannya lagi jaringan berwarna hijau (Sumber : dokumentasi pribadi, 2025)

Hari Munculnya Kalus

Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* 5% diperoleh bahwa pola sterilisasi tidak memberikan pengaruh nyata terhadap hari munculnya kalus (Tabel 10). Waktu tercepat untuk munculnya kalus adalah 12 HST sementara waktu terlama 15 HST. Selanjutnya rata-rata hari munculnya kalus antar pola sterilisasi tidak menunjukkan selisih yang sangat jauh, secara bersama keenam pola sterilisasi menghasilkan rata-rata hari munculnya kalus cenderung saat 13 HST (Gambar 4). Hal ini mengindikasikan bahwa tidak ada konsentrasi bahan sterilan hingga waktu perendaman yang merusak jaringan eksplan yang pada akhirnya mempengaruhi eksplan tumbuh.

Tabel 10. Hasil uji *Kruskal Wallis* hari munculnya kalus

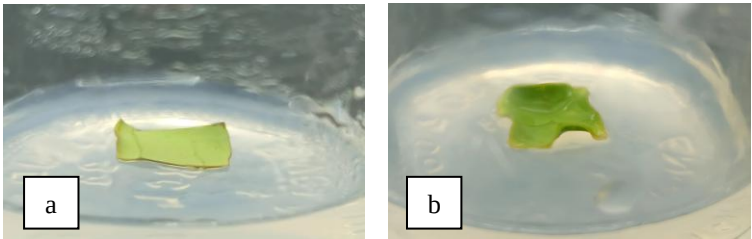
<i>Kruskal Wallis</i> H	Derajat Bebas (db)	Signifikansi
6,587	5	0,253



Gambar 4. Grafik rata-rata hari munculnya kalus pada eksplan. (Sumber : dokumentasi pribadi, 2025)

Bahan sterilan yang umum digunakan dalam kultur jaringan cenderung bersifat toksik terhadap jaringan tanaman. Oleh karena itu, penting untuk menyesuaikan konsentrasi sterilan agar efektif mencegah kontaminasi tanpa merusak atau membunuh eksplan (Shofiyani *et al.*, 2020). Munculnya kalus pada eksplan menandakan bahwa eksplan memberikan respons tumbuh dalam kondisi *in vitro*. Kalus sendiri adalah kumpulan sel *amorfo* yang terbentuk pada jaringan eksplan dan mengalami pembelahan sel secara terus-menerus (Rasud & Bustaman, 2020).

Pada penelitian ini, induksi kalus dimulai dengan terjadinya penebalan dan pembengkakan serta terbentuknya jaringan putih pada bagian eksplan yang terluka (Gambar 5). Penebalan merupakan respon eksplan terhadap pengaruh zat pengatur tumbuh dan kondisi lingkungan kultur, yang menyebabkan ukuran eksplan membesar. Umumnya kalus muncul pertama kali di bagian tepi daun (area sayatan), kemudian berkembang ke bagian tengah. Pembentukan kalus ditandai oleh permukaan eksplan yang membengkak serta munculnya tonjolan-tonjolan putih yang berjejal pada permukaan eksplan. Proses ini terjadi akibat pemberian 2,4-D yang merangsang pembelahan dan memperbanyak sel akibat penyerapan air, nutrisi, dan zat pengatur tumbuh dari media. Munculnya kalus merupakan bentuk respon terhadap luka dan stimulasi dari fitohormon yang tersedia dalam media (Rasud & Bustaman, 2020; Tarigan *et al.*, 2023).



Gambar 5. Tahap awal induksi kalus pada eksplan. (a) eksplan setelah inisiasi, ditanam secara *adaxial faces on medium*; (b) eksplan pada perlakuan P5 setelah 8 HST, menunjukkan gejala awal pembentukan kalus berupa penebalan dan pembengkakan jaringan (Sumber : dokumentasi pribadi, 2025)

Persentase Eksplan Berkalus

Pada tanaman kopi berdasarkan penelitian Asmono *et al.* (2024) rata-rata kemunculan kalus terjadi pada 10 HST sampai dengan 14 HST. Standarisasi hari munculnya kalus ditetapkan pada 14 HST untuk memastikan penilaian yang lebih representatif terhadap efektivitas pola sterilisasi. Oleh karena itu, hanya eksplan daun kopi yang membentuk kalus dalam waktu ≤ 14 HST yang dihitung dalam

persentase eksplan berkalus, sedangkan yang membentuk kalus setelah 14 HST tidak dimasukkan dalam perhitungan.

Berdasarkan hasil uji *Kruskal Wallis* 5% diperoleh pengaruh nyata pola sterilisasi terhadap persentase eksplan berkalus (Tabel 11), sehingga dapat dilakukan uji lanjut. Hasil uji lanjut *Mann Whitney* 5% menunjukkan bahwa persentase eksplan berkalus berbeda nyata pada P1 dan P3, P1 dan P5, serta P2 dan P5 (Tabel 12). Selanjutnya diantara P1, P2, P3, dan P5 yang menghasilkan persentase eksplan berkalus tertinggi ialah P5 yakni sebesar 93,3% (Tabel 13).

Tabel 11. Hasil uji *Kruskal Wallis* persentase eksplan berkalus

<i>Kruskal Wallis</i> H	Derajat Bebas (db)	Signifikansi
11,119	5	0,049

Tabel 12. Hasil uji *Mann Whitney* persentase eksplan berkalus

Perlakuan	Rerata
Pola 1 (P1)	0,40 ± 0,50 ^a
Pola 2 (P2)	0,60 ± 0,50 ^{ab}
Pola 3 (P3)	0,80 ± 0,41 ^{bc}
Pola 4 (P4)	0,66 ± 0,48 ^{abc}
Pola 5 (P5)	0,93 ± 0,25 ^c
Pola 6 (P6)	0,66 ± 0,48 ^{abc}

Keterangan : angka yang diikuti dengan notasi huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata

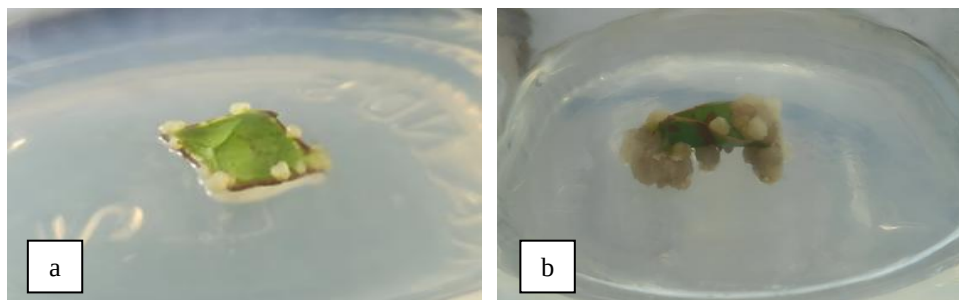
Tabel 13. Persentase eksplan berkalus

Pola Sterilisasi	Persentase
Pola 1 (P1)	40%
Pola 2 (P2)	60%
Pola 3 (P3)	80%
Pola 4 (P4)	66,6%
Pola 5 (P5)	93,3%
Pola 6 (P6)	66,6%

Dampak *browning* dan kontaminasi mempengaruhi pembentukan kalus, hal ini terlihat dari P1 dengan *browning* 46,6%, kontaminasi 53,3% dan P2 *browning* dan kontaminasi secara bersama 33,3%. Sementara P3 dengan *browning* 0%, kontaminasi 20% dan P5 *browning* 0%, kontaminasi 6,6%. Lebih lanjut P1 hanya menyisakan 7 dari 15 eksplan yang tetap hidup, P2 dengan 9 dari 15 eksplan hidup. Dibandingkan P3 dengan 12 dari 15 eksplan hidup serta P5 dengan 14 dari 15 eksplan hidup. Tidak adanya *browning* menyebabkan sel-sel tanaman cepat beregenerasi membentuk kalus, sedangkan eksplan yang mengalami *browning* dan kontaminasi akan mengalami stress dan pada akhirnya mati sehingga eksplan kurang dapat lagi membentuk kalus (Asmono *et al.*, 2021).

Kalus yang ideal untuk kultur jaringan umumnya berwarna putih dan memiliki tekstur remah (*friable*). Kalus remah memiliki ciri-ciri yaitu dapat dipisahkan menjadi sel tunggal karena ikatan yang renggang, ruang antar sel yang besar, dan sangat kaya akan kandungan air. Karakteristik ini sangat mendukung perbanyakan massa kalus melalui teknik kultur suspensi (Rasud & Bustaman, 2020; Tarigan *et al.*, 2023). Kalus berwarna putih menandakan massa sel yang sedang aktif membelah. Warna putih juga mengindikasikan plastida belum terdiferensiasi yang mencirikan kondisi meristematik atau embriogenik. Kalus dengan warna putih menunjukkan kapasitas embriogenik, yang memungkinkan kalus tersebut berkembang menjadi embrio somatik melalui proses embriogenesis somatik (Rasud & Bustaman, 2020; Tarigan *et al.*, 2023).

Pada penelitian ini, didapati ciri kalus yang tumbuh pada eksplan meliputi kalus mula-mula berwarna putih (19 HST) dan berakhir putih kekuningan (30 HST). Kemudian didapati ciri bertekstur remah hingga intermediet (Gambar 6). Perubahan warna kalus dari putih ke putih kekuningan menunjukkan potensi perkembangan menuju sifat embriogenik. Kalus berwarna putih umumnya terdiri dari sel-sel embriogenik yang belum memiliki kloroplas, namun mengandung butiran pati dalam jumlah tinggi (Rasud & Bustaman, 2020).



Gambar 6. Morfologi kalus pada eksplan (a) kalus pada perlakuan P5 pada 19 HST, dengan ciri berwarna putih dan bertekstur remah; (b) kalus pada 30 HST, dengan ciri memiliki kalus berwarna putih kekuningan dan bertekstur remah hingga intermediet (sebagian kompak dan lainnya remah) (Sumber : dokumentasi pribadi, 2025)

KESIMPULAN

1. Pola sterilisasi berpengaruh nyata terhadap hari eksplan terkontaminasi, persentase eksplan terkontaminasi, persentase eksplan *browning*, dan persentase eksplan berkalus, namun tidak berpengaruh nyata terhadap hari munculnya kalus.
2. Pola sterilisasi 5 (P5) merupakan pola sterilisasi paling optimal dengan persentase kontaminasi 6,6%, *browning* 0%, dan eksplan berkalus 93,3%. P5 mencakup, di luar LAFC: dicuci dengan detergen cair, direndam dalam agrept 2 g/L selama 30 menit, benomil 2 g/L selama 30 menit, lalu dibilas dengan air mengalir. Kemudian di dalam LAFC: direndam *tween* 20 (3 tetes/100 mL) selama 15 menit, bayclin bertingkat mencakup bayclin 10% selama 15 menit, bayclin 20% selama 10 menit, bayclin 30% selama 5 menit, alkohol 70% selama 10 detik, serta asam askorbat 300 mg/100 mL selama 25 menit.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, A. R., Nurokhman, A., Rahayu, S. C., Metalisa, E., dan Novitasari, L. 2022. Faktor Kontaminasi Kultur Jaringan pada Eksplan Biji Duku (*Lansium domesticum* Corr.) Menggunakan Media Murashige and Skoog. Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi 2022, Program Studi Pendidikan Biologi, UIN Raden Fatah Palembang. hal. 136–141. <https://proceedings.radenfatah.ac.id/index.php/semnaspbio>
- Admojo, L., dan Indrianto, A. 2016. Pencegahan Browning Fase Inisiasi Kalus Pada Kultur Midrib Daun Klon Karet (*Hevea brasiliensis* Muell Arg) PB 330. *Indonesian Journal of Natural Rubber Research*. 34(1): 25-34. DOI : <https://doi.org/10.22302/ppk.jpk.v34i1.220>
- Admojo, L., dan Prasetyo, N. E. 2018. Optimasi Perlakuan Eksplan Pada Kultur Organ Vegetatif Tanaman Karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Klon Pb 330. *Warta Perkaratan*. 37(2), 61-74. DOI : <https://doi.org/10.22302/ppk.wp.v37i2.581>
- Agustiningrum, E., Hardarani, N., dan Susanti, H. 2023. Teknik Sterilisasi Eksplan Daun Lahung (*Durio dulcis*) pada Media MS Secara In Vitro. *AGROSCRIPT: Journal of Applied Agricultural Sciences*. 5(2): 65-80. DOI : <https://doi.org/10.36423/agroscript.v5i2.1248>

- Andriani D., dan Heriansyah, P. 2021. Identifikasi Jamur Kontaminan pada Berbagai Eksplan Kultur Jaringan Anggrek Alam (*Bromheadia finlaysoniana* (Lind.) Miq. *Agro Bali: Agricultural Journal*. 4(2): 192-199. DOI : <https://doi.org/10.37637/ab.v4i2.723>
- Arimarsetiowati, R. 2019. Sterilisasi Eksplan Daun Dalam Perbanyakan Bibit Kopi Arabika Melalui Somatik Embriogenesis. *Warta: Pusat Penelitian Kopi Dan Kakao Indonesia*. 31(2): 6–10. <https://warta.iccri.net/wp-content/uploads/2023/06/2.-Rina-Sterilisasi-Kopi-Arabika-6-10.pdf>
- Asmono, S. L., Rahmawati, Husna, H., Sulala, A., Auliya, S., dan Cahyono, E. H. 2024. Pembentukan Kalus pada Eksplan Daun Kopi Robusta dan Arabika pada Beberapa Konsentrasi Media MS (Murashige and Skoog). *AGROPROSS National Conference Proceedings of Agriculture*. 5(1): 574-581. <https://proceedings.polije.ac.id/index.php/agropross/article/view/775>
- Asmono, S. L., Wardana, R., dan Rahmawati. 2022. Optimization Of The Sterilization Method For Leaf Explant Robusta BP 308 Coffee In Vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 980(1): 1-8. DOI : <https://doi.org/10.1088/1755-1315/980/1/012001>
- Asmono, S. L., Wardana, R., dan Rahmawati, R. 2021. Optimasi Metode Sterilisasi Eksplan Daun Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) dan Robusta (*Coffea canephora* Var. Robusta chev.) secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Inovasi*. 21(3): 140-145. DOI : <https://doi.org/10.25047/jii.v21i3.2916>
- Chika, S., Ismaini, L., dan Armanda, D. T. 2022. Teknik Sterilisasi Eksplan *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. dengan Penambahan Asam Askorbat dan Natrium Hipoklorit (NaOCl) Secara In Vitro. *Berkala Ilmiah Biologi*. 13(2): 32-41. DOI : <https://doi.org/10.22146/bib.v13i2.4692>
- Direktorat Statistik Tanaman Pangan, Hortikultura, dan Perkebunan. 2024. *Statistik Kopi Indonesia 2023* (Vol.8). Jakarta: Badan Pusat Statistik. <https://www.bps.go.id/id/publication/2024/11/29/d748d9bf594118fe112fc51e/statistik-kopi-indonesia-2023.html>
- Fitriani, Y., Wijana, G., dan Darmawati, I. A. P. 2019. Teknik Sterilisasi Dan Efektivitas 2,4-D Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) In Vitro. *Journal Agriculture Science and Biotechnol.* 8(1): 41-52. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jasb/article/view/54630>
- Food and Agriculture Organization of the United, & Nations. 2023. Top 10 Country Production Coffe Green. https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country diakses pada 27 Juni 2025.
- Guntur, G., Restu, M., & AR, M. U. 2019. Aplikasi Berbagai Zat Antioksidan Sebagai Penghambat Browning Media Tanam Eksplan Jati Putih (*Gmelina arborea* Roxb) Secara In Vitro. *Jurnal Eboni*. 1(1), 12-24.
- Handayani, A. T., Sandra, E., dan Faizah, H. 2022. Optimasi Sterilisasi Eksplan Daun Tanaman Lidah Mertua (*Sansevieria* sp.) pada Kultur In Vitro. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*. 10(1): 109-124. DOI : <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v10i1.4808>
- Hapsoro, D., Setiawan, D., Hamiranti, R., dan Yusnita, Y. 2019. Pengaruh 2-iP, BA, 2, 4-D, dan TDZ pada Embriogenesis Somatik In Vitro Kopi Robusta Unggul Lampung. *Jurnal Agrotek Tropika*. 7(3): 527-537. DOI : <https://doi.org/10.23960/jat.v7i3.3545>
- Harahap, F., Bangun, E. F., Suriani, C., Edi, S., Ningsih, A. P., dan Nusyirwan. 2023. Variasi Waktu Dan Sterilisasi Untuk Anggrek *Cattelya* sp. Sebelum Penanaman In-Vitro. *Best Journal (Biology Education, Sains and Technology)*. 6(2): 492-498. <https://jurnal.uisu.ac.id/index.php/best/article/view/8081>
- Harahap, F., Suriani, C., Poerwanto, R., dan Siallagan, J. 2015. Sterilization of Pineapple Explant From Sipahutar, North Sumatera, Indonesia (*Ananas comosus* L.) and In Vitro Growth Induction. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*. 17(2): 469-478. <https://digilib.unimed.ac.id/id/eprint/1426/2/Fulltext.pdf>

- Helena, A., Restiani, R., & Aditiyarini, D. 2022. Optimasi Antioksidan sebagai Penghambat Browning pada Tahap Inisiasi Kultur In Vitro Bambu Petung (*Dendrocalamus asper*). *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. 7(2), 86-93. DOI : <https://doi.org/10.24002/biota.v7i2.4715>
- Heriansyah, P., dan Indrawanis, E. 2020. Uji Tingkat Kontaminasi Eksplan Anggrek *Bromheadia finlysoniana* L. miq dalam Kultur In-Vitro dengan Penambahan Ekstrak Tomat. *Jurnal Agroqua*. 18(2): 223-232. DOI : <https://doi.org/10.32663/ja.v18i2.1502>
- Hutabarat, C. T., Restiani, R., dan Aniek, P. 2022. Pengaruh Sterilisasi Tunggal dan Kombinasi pada Kultur In Vitro Nodus Kepel (*Stelechorcarpus burahol* Hook F. & Thomson). *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*. 9(2): 235-246. DOI : <https://doi.org/10.24843/metamorfosa.2022.v09.i02.p02>
- Maharani, S., Haryono, N. Y., dan Mariana, B. D. 2022. Analisis Pengaruh Konsentrasi Pemberian Fungisida Benomil Terhadap Sterilisasi Kultur Jaringan Ruas Batang Tanaman Jeruk Tawangmangu. Prosiding Seminar Bioteknologi Nasional (SimBioN) 2022, Malang, 27 Agustus 2022, hal. 109-120. <https://conference.um.ac.id/index.php/LAS/article/view/7846/2301>
- Meidina, F., Hidayat, Y., dan Dewi, S. P. 2018. Optimasi Metode Sterilisasi Eksplan dalam Kultur Jaringan Bambu Hitam (*Gigantochloa atroviolaceae* Widjaja) dan Bambu Haur (*Bambusa tuldoidea* Munro). Prosiding Seminar Nasional Silvikultur Ke VIII Jurusan Kehutanan, Universitas Lampung, hal. 122-132. https://hutan.fp.unila.ac.id/wp-content/uploads/2022/09/122-132_PROSIDING-SEMNAS-SVK-8-berISSN.pdf
- Meliala, M. E. B., dan Taufiq, M. 2024. Efektivitas Market Research Dalam Meningkatkan Pemahaman Pasar dan Ekspor Produk UMKM Kopi Sidikalang. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 10(18): 656-666. DOI : <https://doi.org/10.5281/zenodo.13937845>
- Pratiwi, D. R., Wening, S., Nazri, E., dan Yenni, Y. 2021. Penggunaan Alkohol dan Sodium Hipoklorit Untuk Sterilisasi Eksplan Kelapa Sawit. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit*. 29(1): 1-10. <https://doi.org/10.22302/iopri.jur.jpks.v29i1.120>
- Priantari, I., dan Dharmawan, A. 2022. Karakterisasi Kopi Arabica (*Coffea arabica*) Varietas Komasti dan Andungsari dengan Level Sangrai. *Jurnal Biologi UNAND*. 10(1): 33-41. DOI : <https://doi.org/10.25077/jbioua.10.1.33-41.2022>
- Rasud, Y., dan Bustaman. 2020. Induksi Kalus secara In Vitro dari Daun Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dalam Media dengan Berbagai Konsentrasi Auksin. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia (JIPi)*. 25(1): 67-72. DOI : <https://doi.org/10.18343/jipi.25.1.67>
- Rismayanti, A. Y., dan Nafi'ah, H. H. 2021. Modifikasi Media Pada Induksi Kalus Kopi Arabika (*Coffea Arabica* L.) Berbuah Kuning. *Agro Wiralodra*. 4(2): 42-49. DOI : <https://doi.org/10.31943/agrowiralodra.v4i2.60>
- Saha, S., Mahinoor, S. S., Yasmin, S., dan Khatun, F. 2022. Efficacy of Commonly Used Sterilant 70% (w/v) Ethanol In Controlling Identified Surface Microbes In Biotechnology Laboratory. *Journal of Bangladesh Agricultural University*. 20(2): 175-186. https://www.researchgate.net/publication/361394431_Efficacy_of_commonly_used_sterilant_70_wv_ethanol_in_controlling_identified_surface_microbes_in_biotechnology_laboratory
- Sanjaya, B. R. L., Wahyuni, D., dan Asyiah, I. N. 2016. Perbedaan Daya Hambat *Pseudomonas diminuta*, *Pseudomonas fluorescens* dan *Pseudomonas putida* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Ralstonia solanacearum*. *Berkala Sainstek*. 1(1): 1-5. <https://www.researchgate.net/profile/Bella-Sanjaya/publication/325841448>
- Shofiyani, A., Purnawanto, A. M., dan Aziz, R. Z. A. 2020. Pengaruh Berbagai Jenis Sterilan dan Waktu Perendaman Terhadap Keberhasilan Sterilisasi Eksplan Daun Kencur (*Kaempferia galanga* L.) Pada Teknik Kultur In Vitro. *Agritech: Jurnal Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto*. 22(1): 29-39. DOI : <https://doi.org/10.30595/agritech.v22i1.7523>
- Silaban, R., Sinaga, H., dan Karo-Karo, T. 2023. Pengaruh Jenis Kemasan Terhadap Karakteristik Fisikokimia Dan Sensori Kopi Arabika Gayo Dengan Metode Pengolahan Semi Basah. *Jurnal*

- Teknologi Pangan Dan Hasil Pertanian*. 18(2): 13-21. DOI : <https://doi.org/10.26623/jtphp.v18i2.7259>
- Sinaga, A., Sianturi, C. M., dan Pasaribu, V. 2024. Analisis Kegiatan Pemberdayaan Petani Kopi dalam Peningkatan Hasil Produksi Kopi di Kecamatan Sidikalang, Kabupaten Dairi. *Journal of Social Science and Digital Marketing (JSSDM)*. 4(1): 27-37. DOI : <https://ojs.stmikdharmapalariau.ac.id/index.php/jssdm/article/view/872>
- Sugiari, L. P., Sritamin, M. A. D. E., dan Dwiyan, R. 2020. Induksi Tunas Tanaman Rasberi Hitam (*Rubus occidentalis* L.) Melalui Direct Organogenesis Secara In Vitro. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 9(4), 299-308. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jat/article/view/68530>
- Supriadi, H., Ferry, Y., dan Ibrahim, M. S. 2018. *Teknologi Budidaya Tanaman Kopi*. Jakarta: IAARD Press.
- Surya, M. I., dan Ismaini, L. 2021. Perbandingan Metode Sterilisasi Untuk Perbanyakan *Rubus rosifolius* Secara in Vitro. *Al-Kaunyah: Jurnal Biologi*. 14(1): 127-137. DOI : <https://doi.org/10.15408/kaunyah.v14i1.16325>
- Tarigan, S. D. S., Astarini, I. A., dan Astiti, N. P. A. 2023. Inisiasi Kalus Bangle (*Zingiber purpureum* Roscoe) pada Beberapa Kombinasi 2,4-D Dan Kinetin. *Jurnal Hortikultura Indonesia (JHI)*. 14(2), 93-99. DOI : <https://doi.org/10.29244/jhi.14.2.93-99>