



Optimalisasi Sterilisasi Eksplan Daun Kopi Arabika Sidikalang (*Coffea arabica* L) Untuk Penanaman *In Vitro*

¹Theresia Lubis, ^{2*}Fauziyah Harahap, ³Jesika Febriani Damanik, ⁴Wardah Arizah Batubara, ⁵Ichlasul Adelia, ⁶Dwi Apriliani, ⁷Ummi Sohada

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

*Corresponding Author e-mail: fauziyahharahap@unimed.ac.id

Received: July 2025; Revised: August 2025; Accepted: September 2025; Published: September 2025

Abstrak: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dan pola sterilisasi yang optimal dalam menekan pertumbuhan kontaminasi pada kultur *in vitro* eksplan daun kopi Arabika Sidikalang (*Coffea arabica* L.). Penelitian ini dilaksanakan dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 taraf perlakuan dan 15 ulangan. Analisis data menggunakan uji *Kruskal Wallis* dan apabila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* pada taraf 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pola sterilisasi berpengaruh secara signifikan terhadap waktu munculnya kontaminasi, persentase eksplan terkontaminasi, persentase eksplan *browning*, dan persentase eksplan membentuk kalus. Namun tidak berpengaruh secara signifikan pada waktu munculnya kalus. Pola sterilisasi 5 terbukti paling optimal dalam menekan kontaminasi, dengan persentase kontaminasi terendah (6,6%), *browning* (6,6%), 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 (20 menit), bayclin bertingkat 10%, 20% dan 30% (selama 20, 15, dan 5 menit), alkohol 70% (20 detik), dan asam askorbat (20 menit).

Kata Kunci: Kopi Arabika; kultur jaringan; sterilisasi; kontaminasi; kalus

Abstract: This study aimed to determine the effect and identify the optimal sterilization pattern for suppressing contaminant growth in the *in vitro* culture of Sidikalang Arabica coffee (*Coffea arabica* L.) leaf explants. The experiment was conducted using a completely randomized design (CRD) with five treatment levels and 15 replications. Data were analyzed using the *Kruskal Wallis* test, and if significant differences were found, the *Mann Whitney* test was applied at a 5% significance level. The results showed that sterilization patterns significantly affected the time to contamination onset, the percentage of contaminated explants, the percentage of *browning* explants, and the percentage of explants forming callus. However, no significant effect was observed on the time of callus initiation. Sterilization pattern 5 was identified as the most optimal in suppressing contamination, with the lowest contamination percentage (6,6%), *browning* (6,6%), and the highest callus formation (93,3%). This pattern involved washing with detergent; soaking in Agrept (30 minutes) and Benlate (30 minutes); followed by sterilization in a laminar airflow cabinet (LAFC) using Tween 20 (20 minutes), graded Bayclin at 10%, 20%, and 30% (for 20, 15, and 5 minutes, respectively), 70% alcohol (20 seconds), and ascorbic acid (20 minutes).

Keywords: Arabica coffee; tissue culture; sterilization; contamination; callus

How to Cite: Lubis, T., Harahap, F., Damanik, J. F., Batubara, W. A., Adelia, I., Apriliani, D., & Sohada, U. (2025). Optimalisasi Sterilisasi Eksplan Daun Kopi Arabika Sidikalang (*Coffea arabica* L.) Untuk Penanaman *In Vitro*. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 13(3), 2216–2233. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v13i3.17664>



<https://doi.org/10.33394/bioscientist.v13i3.17664>

Copyright© 2025, Lubis et al

This is an open-access article under the CC-BY-SA License.



PENDAHULUAN

Kopi termasuk salah satu komoditas perkebunan utama di Indonesia yang memberikan kontribusi besar terhadap perekonomian nasional. Selain menjadi sumber devisa, kopi juga menciptakan lapangan kerja dan menjadi sumber pendapatan bagi petani serta pihak-pihak lain yang terlibat dalam budidaya, pengolahan, dan pemasaran kopi. Indonesia menempati posisi sebagai produsen kopi keempat terbesar di dunia, setelah Brasil, Vietnam, dan Kolombia, dengan sekitar 95% produksinya berasal dari perkebunan rakyat. Dari jumlah tersebut, sekitar 83% adalah kopi Robusta dan 17% kopi Arabika (Asosiasi Eksportir dan Industri Kopi Indonesia, 2025; Kurniawan, 2017).

Kecamatan Sidikalang, terletak di Kabupaten Dairi, Provinsi Sumatera Utara. Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik Kabupaten Dairi (2023), pada tahun 2021 luas perkebunan kopi Arabika di kabupaten ini mencapai 12.104 hektare, dengan total produksi mencapai 9.620 ton. Sumatera Utara merupakan provinsi dengan produksi kopi Arabika tertinggi di Indonesia. Perkebunan kopi Sidikalang terletak pada ketinggian sekitar 1.500 meter di atas permukaan laut, di kawasan pegunungan Bukit Barisan. Kopi Sidikalang dikenal sebagai salah satu varietas kopi unggulan di Sumatra dan memiliki kualitas yang sebanding dengan kopi Gayo maupun Simalungun. Ciri khas yang membedakan kopi Sidikalang dari kopi daerah lain terletak pada profil rasanya, terutama pada kopi Arabika organik. Kopi ini dikenal memiliki cita rasa yang kuat dengan *aftertaste* yang bertahan lama di mulut setelah dikonsumsi. Permintaan pasar global terhadap kopi Arabika yang terus meningkat mempengaruhi masyarakat untuk mengalihkan sebagian lahannya untuk menanam kopi Arabika (Tarigan & Karo, 2023).

Produksi kopi Arabika di Kecamatan Sidikalang dalam beberapa tahun terakhir cenderung stagnan. Salah satu penyebab utama adalah terbatasnya ketersediaan bibit unggul di kalangan petani, sehingga menghambat upaya peremajaan tanaman dan intensifikasi budidaya kopi (Sinaga *et al.*, 2024). Kopi Arabika bisa diperbanyak secara generatif melalui biji atau secara vegetatif dengan menggunakan metode seperti stek, okulasi, dan sambung pucuk. Pada perbanyakan generatif, benih yang digunakan harus berasal dari kebun benih bersertifikat untuk memastikan mutu (Supriadi *et al.*, 2018). Pada perbanyakan secara vegetatif menghasilkan bibit yang genetiknya sama persis dengan induk, tetapi jumlah bibit yang dapat diperoleh terbatas karena tergantung pada ketersediaan cabang tanaman sebagai bahan tanam (Ibrahim *et al.*, 2013).

Produktivitas dari Kopi Arabika dapat ditingkatkan dengan cara kultur jaringan. Kultur jaringan adalah metode perbanyakan tanaman secara *in vitro* yang memungkinkan bagian tertentu dari tanaman, seperti sel atau jaringan, berkembang dalam kondisi steril. Teknik ini memastikan bahwa bagian yang ditumbuhkan dapat meregenerasi diri menjadi tanaman baru dengan karakteristik yang sama dengan induknya (*true to type*) (Supriadi *et al.*, 2018; Harahap *et al.*, 2023). Eksplan adalah bagian tanaman yang digunakan untuk pengulturan awal. Eksplan dapat berupa pucuk tunas, potongan batang satu buku, potongan daun atau akar, kotiledon, aksis embrio pada biji, biji utuh, bagian bunga, dan sebagainya (Harahap *et al.*, 2019). Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun. Pemilihan daun sebagai sumber eksplan dikarenakan daun memiliki jaringan meristematik yang aktif untuk diferensiasi menjadi tunas atau kalus. Eksplan daun memiliki kemampuan regenerasi yang tinggi dalam perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan (Hapsoro & Yusnita, 2018).

Pelaksanaan kultur jaringan membutuhkan kondisi aseptik atau steril. Kendala utama yang sering dihadapi adalah adanya kontaminasi. Kehadiran kontaminan dapat menghambat bahkan menggagalkan pertumbuhan eksplan, sehingga menurunkan tingkat keberhasilan kultur *in vitro* (Handayani *et al.*, 2022). Kontaminasi pada kultur jaringan dapat bersumber dari faktor internal maupun eksternal. Faktor internal biasanya berasal dari jaringan eksplan itu sendiri, kontaminasi jenis ini bersifat endogen sehingga tidak dapat diatasi hanya dengan sterilisasi permukaan (Fitriani *et al.*, 2019). Sementara itu, faktor eksternal umumnya disebabkan oleh kondisi lingkungan kerja yang kurang steril, seperti ruang kultur yang tidak bersih, prosedur penanaman di dalam laminar yang kurang tepat, serta penggunaan media dan instrumen yang tidak sepenuhnya steril (Saepudin *et al.*, 2020). Tingkat kontaminasi pada eksplan dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain jenis tanaman, asal

eksplan, jenis jaringan, prosedur sterilisasi, serta kondisi lingkungan kultur. Kontaminasi pada eksplan yang berasal dari lapangan sangat sulit diatasi karena permukaannya banyak mengandung kotoran dan mikroorganisme yang akan mengganggu proses pengkulturan.

Penerapan pola sterilisasi yang tepat sangat penting untuk mencegah kontaminasi pada eksplan. Teknik sterilisasi permukaan umumnya digunakan untuk menghilangkan kontaminasi yang menempel pada bagian luar maupun yang terbawa ke dalam jaringan eksplan. Jika tidak dieliminasi, mikroorganisme tersebut dapat menimbulkan kontaminasi yang akhirnya menghambat proses pertumbuhan eksplan hingga menjadi tanaman (Asni *et al.*, 2018; Harahap *et al.*, 2023). Selama perlakuan sterilisasi, zat sterilan hanya menargetkan kontaminan, sementara eksplan harus tetap hidup (Hamdani *et al.*, 2020). Pemilihan pola sterilisasi eksplan mempertimbangkan sumber eksplan yang digunakan (Asmono *et al.*, 2021). Proses ini mencakup pemilihan dan penerapan bahan sterilisasi dengan mempertimbangkan jenis bahan kimia, konsentrasi yang digunakan, durasi perendaman, serta urutan penggunaan bahan sterilan guna meminimalkan risiko kontaminasi.

Oleh karena itu, optimalisasi pola sterilisasi menjadi langkah penting untuk memastikan keberhasilan *kultur in vitro*. Optimalisasi ini dapat dilakukan melalui pengujian berbagai kombinasi bahan sterilan dan parameter perlakuan untuk menemukan kondisi yang paling efektif dalam menjaga viabilitas dan kemampuan regenerasi eksplan. Dengan dilakukannya penelitian ini diharapkan dapat mengetahui pengaruh dan pola sterilisasi yang optimal dalam menekan pertumbuhan kontaminan pada kultur *in vitro* eksplan daun kopi Arabika Sidikalang (*Coffea arabica* L.)

METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan mulai Maret-Juni tahun 2025, di Laboratorium Kultur Jaringan YAHD Perum Pelabuhan Jl. Lambung No.16 Tanah 600 Medan Marelán. Sumber eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bibit kopi Arabika Sidikalang (*Coffea arabica* L.) yang berumur 5-7 bulan

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: botol kultur, gelas beaker, kompor gas, lampu bunsen, pinset, spatula, scalpel, cawan petri, autoklaf, pipet volume, hand sprayer, aluminium foil, Laminar Air Flow Cabinet (LAF), pan, sendok, batang pengaduk, gelas ukur, pH meter, pemanas, timbangan analitik, lemari pendingin, tissue, karet gelang, gunting, tisu steril, kertas label, rak kultur, masker, jas laboratorium, dan alat tulis. Bagian tanaman yang digunakan sebagai eksplan diambil dari daun kedua dan ketiga. Media yang digunakan pada penanaman adalah Media $\frac{1}{2}$ *Murashige and Skoog* (MS), dengan penambahan ZPT 2,4-D dan Kinetin. Bahan lain berupa gula, alkohol 70%, alkohol 96%, akuades, detergen, tween-20, benlate, agrept, mancozeb, agrimycin, carbendazim, bayclin 30%, bayclin 20%, bayclin 10%, bayclin 5%, asam askorbat.

Desain Penelitian

Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) non-faktorial, yang terdiri dari 5 taraf perlakuan dan 15 ulangan, sesuai perhitungan berdasarkan rumus Federer $(t-1)(r-1) \geq 15$. Perlakuan yang diterapkan disusun berdasarkan pola sterilisasi, dengan mempertimbangkan efektivitas dalam menghilangkan kontaminasi tanpa merusak eksplan. Media yang digunakan untuk penanaman adalah Media $\frac{1}{2}$ *Murashige and Skoog* (MS), ditambah dengan zat pengatur tumbuh berupa 1 ppm 2,4-D dan 1 ppm Kinetin.

Tabel 1. Pola sterilisasi dengan variasi bahan sterilan yang digunakan

Pola	Perawatan	Bahan Sterilisasi (Perlakuan)	Konsentrasi	Durasi
P1	Di luar LAFC	Deterjen (dicuci)	2ml/L	15 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Mankozeb 80WP	2 gr/L	30 menit
		Agrimycin	2gr/L	20 menit
	Di dalam LAFC	Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Bayclin	10%	20 menit
		Tween 20	5 tetes	-
		Bayclin	20%	15 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Alkohol	70 %	15 detik
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Asam askorbat	300mg	20 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
P2	Di Luar LAFC	Deterjen (dicuci)	2ml/L	15 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Benomil	2gr/L	30 menit
		Agrimycin	2gr/L	30 menit
	Di dalam LAFC	Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Alkohol	70%	1 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Tween 20	5 tetes	20 detik
		Bayclin	5%	20 menit
		Bayclin	10%	10 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Asam askorbat	200mg	20 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
P3	Di Luar LAFC	Deterjen (dicuci)	2ml/L	15 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Benlate	2gr/L	20 menit
		Agrept	2gr/L	30 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Tween 20	5 tetes	20 menit
		Bayclin	20%	30 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Alkohol	70%	30 detik
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
P4	Di Luar LAFC	Deterjen (dicuci)	2ml/L	15 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Carbendazim	2gr/L	1 jam
		Agrimycin	2gr/L	-
	Di dalam LAFC	Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Alkohol	70%	10 detik
		Bayclin	10%	20 menit
		Tween 20	5 tetes	-
P5	Di Luar LAFC	Deterjen (dicuci)	2ml/L	15 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Benlate	2gr/L	30 menit
		Agrept	2gr/L	30 menit
	Di dalam LAFC	Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Tween 20	5 tetes	20 menit
		Bayclin	10%	20 menit
		Bayclin	20%	15 menit
		Bayclin	30%	5 menit
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Alkohol	70%	20 detik
		Bilas 3 kali dengan Akuades steril	-	-
		Asam askorbat	100mg	20 menit

Sterilisasi Eksplan

Eksplan daun kopi Arabika disterilisasi dengan menggunakan pola sterilisasi yang telah disusun, berdasarkan pertimbangan efektivitas dalam menghilangkan kontaminasi tanpa merusak eksplan. Pola sterilisasi pada penelitian ini ada 5 pola sterilisasi dengan variasi bahan sterilan yang dapat dilihat pada tabel 1.

Penanaman Eksplan

Eksplan hasil sterilisasi diletakkan di dalam petridish yang sudah steril dan daun dipotong menjadi bentuk persegi dengan ukuran 1x1 cm. kemudian potongan eksplan ditanam dalam media, selanjutnya mulut botol kultur dibakar dengan api bunsen. Botol ditutup rapat dengan menggunakan plastik, kemudian botol kultur yang telah ditanami eksplan disimpan kedalam rak kultur. Botol eksplan disimpan dalam ruang kultur, dan dilakukan pengamatan terhadap parameter. Pengamatan dilakukan hingga hari ke 30 setelah tanam (hst).

Parameter Pengamatan

1. Waktu munculnya kontaminasi: diamati sejak eksplan mulai ditanam hingga munculnya kontaminasi pertama kali.
2. Persentase Eksplan Terkontaminasi: dilakukan dengan cara menghitung eksplan yang terkontaminasi oleh mikroorganisme, seperti jamur dan bakteri sejak 1 minggu setelah tanam.

$$\% \text{ Kontaminasi} = \frac{\text{Jumlah eksplan terkontaminasi}}{\text{total eksplan}} \times 100\%$$

3. Persentase Eksplan *Browning*: dilakukan dengan mengamati perubahan warna pada eksplan yang ditandai dengan perubahan warna eksplan menjadi coklat. Pengamatan eksplan *browning* dilakukan per minggu setelah tanam.

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

4. Waktu Munculnya Kalus: diamati sejak eksplan mulai ditanam hingga adanya tanda tanda munculnya kalus.
5. Persentase Eksplan Membentuk Kalus: pengamatan dilakukan dengan mengamati dan menghitung jumlah eksplan yang membentuk kalus sampai hari akhir pengamatan.

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

Analisis Data

Analisis data penelitian dilakukan menggunakan SPSS versi 30. Sebelum analisis utama, data pengamatan diuji terlebih dahulu dengan uji prasyarat, yaitu normalitas dan homogenitas. Apabila data memenuhi syarat normal dan homogen, analisis dilakukan dengan uji ANAVA untuk mengetahui pengaruh pola sterilisasi terhadap keberhasilan sterilisasi eksplan daun kopi Arabika Sidikalang, dan bila signifikan dilanjutkan dengan uji Duncan 5%. Namun, apabila data tidak normal dan tidak homogen, digunakan uji nonparametrik, yaitu uji *Kruskal Wallis* pada taraf signifikansi 5%, untuk melihat perbedaan antar kelompok. Jika uji *Kruskal Wallis* signifikan, dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* pada taraf 5% untuk membandingkan median dua kelompok independen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, uji normalitas data dilakukan dengan Kolmogorov–Smirnov menggunakan SPSS versi 30 pada taraf signifikansi 5% ($\alpha = 0,05$). Data dianggap berdistribusi normal apabila nilai signifikansi (sig) > 0,05, sedangkan nilai sig < 0,05 menunjukkan data tidak normal. Hasil pengujian menunjukkan bahwa data

pengamatan tidak memenuhi distribusi normal ($\text{sig} < 0,05$), sehingga analisis One-Way ANOVA tidak dapat diterapkan. Sebagai alternatif, digunakan uji non-parametrik *Kruskal Wallis* yang tidak memerlukan asumsi normalitas. Apabila uji *Kruskal Wallis* menunjukkan pengaruh yang signifikan, uji lanjutan *Mann Whitney* dilakukan pada taraf signifikansi 5%.

Waktu Muncul Kontaminasi

Hasil uji *Mann Whitney* pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa waktu munculnya kontaminasi berbeda secara nyata ($P < 0,05$) antara P2 dan P3, P2 dan P5, P3 dan P4, serta P4 dan P5 (Tabel 2). Sebaliknya, perbedaan antara P1, P2, dan P4 tidak signifikan. Berdasarkan (Tabel 3), P5 memiliki waktu kontaminasi tercepat, namun jumlah kontaminasinya paling sedikit, yaitu 1 dari 15 ulangan.

Tabel 2. Hasil uji *Kruskal Wallis* waktu muncul kontaminasi

Waktu muncul kontaminasi	
<i>Kruskal Wallis H</i>	13,793
Df	4
Asymp. Sig.	0.008

Tabel 3. Hasil uji *Mann Whitney* waktu muncul kontaminasi

Perlakuan	Rerata
Pola 1 (P1)	4,13±5,35ab
Pola 2 (P2)	5,80±7,25a
Pola 3 (P3)	2,67±7,28b
Pola 4 (P4)	6,73±5,94a
Pola 5 (P5)	0,33± 1,29b

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

Berdasarkan hasil penelitian, pola sterilisasi P5 merupakan perlakuan dengan waktu muncul kontaminasi paling cepat, yaitu rata-rata 0,33 hst. Meskipun kontaminasi muncul sangat cepat, jumlah eksplan yang terkontaminasi pada P5 hanya 1 dari 15 ulangan (6,6%). Hal ini menunjukkan bahwa pola P5 efektif menekan pertumbuhan kontaminan, karena sebagian besar eksplan tetap steril dan hanya sedikit yang gagal bertahan. Sebaliknya, pola sterilisasi P4 memiliki rata-rata waktu muncul kontaminasi paling lama, yaitu 6,73 hst, tetapi justru menghasilkan tingkat kontaminasi tertinggi, yakni 10 dari 15 ulangan (66,6%). Rata-rata waktu muncul kontaminasi pada P4 tampak tinggi karena jumlah eksplan yang terkontaminasi banyak dan bervariasi dalam waktu kemunculannya, sehingga nilai rata-ratanya menjadi lebih besar. Dengan demikian, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keefektifan pola sterilisasi lebih tepat dinilai berdasarkan persentase kontaminasi daripada hanya melihat rata-rata waktu muncul kontaminasi. Pola P5 terbukti sebagai metode sterilisasi yang paling efektif, sementara P4 merupakan pola yang paling kurang efektif.

Dalam penelitian ini, kontaminasi tercepat terjadi pada hari ke-5 setelah tanam (hst) pada pola sterilisasi P5, sedangkan kontaminasi paling lambat muncul pada hari ke-25 hst pada pola P3. Hasil pengamatan waktu terjadinya kontaminasi menunjukkan bahwa setiap perlakuan menghasilkan variasi waktu yang berbeda-beda. Tujuan pengamatan ini adalah untuk mengetahui kapan kontaminasi mulai muncul berdasarkan pola sterilisasi yang diterapkan. Waktu munculnya kontaminasi dikategorikan menjadi dua, yaitu kontaminasi eksternal dan internal. Kontaminasi internal berasal dari organisme yang terbawa dari jaringan eksplan dan biasanya

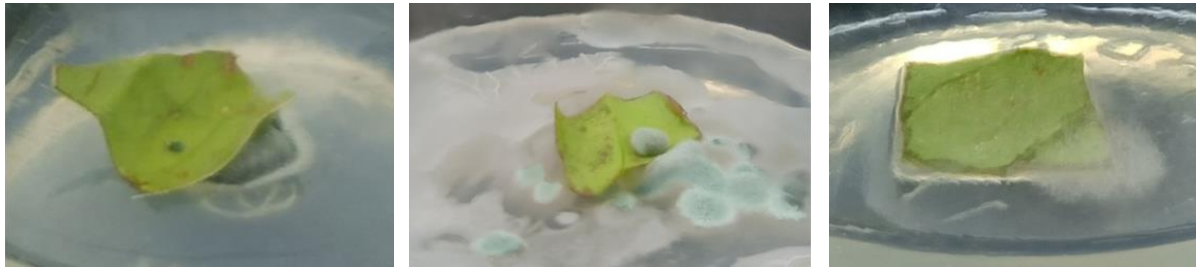
muncul setelah 7 hst, sedangkan kontaminasi eksternal berasal dari permukaan eksplan dan muncul sebelum 7 hst.

Kontaminasi eksternal dapat terjadi akibat masuknya mikroorganisme melalui media, wadah kultur, atau peralatan yang tidak sepenuhnya steril. Selain itu, faktor lingkungan kerja dan ruang kultur yang kurang terjaga, serta ketidakhati-hatian selama proses pelaksanaan, juga dapat menjadi sumber kontaminasi (Saepudin *et al.*, 2020; Shofiyani & Damajanti, 2015). Kontaminasi internal bersumber dari jaringan internal eksplan, yang tidak dapat dihilangkan hanya melalui sterilisasi permukaan, misalnya keberadaan bakteri endofit. Mikroorganisme, termasuk bakteri endofit, dapat keluar dari jaringan tanaman ketika eksplan menyerap nutrisi dari media kultur, lalu berkembang biak di dalam media tersebut. Lingkungan *in vitro* yang kaya akan sukrosa dan nutrisi, ditambah dengan kelembaban tinggi serta suhu hangat, menciptakan kondisi yang sangat mendukung pertumbuhan mikroorganisme secara cepat. Situasi ini pada akhirnya menghambat perkembangan eksplan, bahkan dapat menyebabkan kematian jaringan tanaman (Chika *et al.*, 2022; Fitriani *et al.*, 2019).

Jenis kontaminasi pada setiap pola sterilisasi yang dilakukan didominasi oleh jamur. Kontaminasi jamur umumnya ditandai dengan adanya serat halus berwarna putih di sekitar permukaan media (Asmono *et al.*, 2021). Jamur yang sering menjadi penyebab kontaminasi pada kultur jaringan biasanya berasal dari kelas Deuteromycetes dan Zygomycetes. Sesuai dengan penelitian Oratmangun (2017) pada kultur jaringan kalus *Catharanthus roseus*, jamur yang sering muncul sebagai kontaminan meliputi *Rhizopus* dan *Mucor* yang berasal dari kelas Zygomycetes. Ciri-ciri koloni jamur ini biasanya berwarna putih namun, ada juga yang berwarna abu-abu dengan permukaan yang kasar. Pada penelitian Sulichantini *et al.* (2024) mengungkapkan bahwa kontaminasi pada kultur jaringan pisang disebabkan oleh kehadiran jamur dan bakteri. Adapun jamur yang menjadi penyebab kontaminasi terdiri dari empat jenis, yaitu *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Rhizoctonia* sp., dan *Rhizopus* sp.

Kontaminasi akibat jamur biasanya mudah dikenali pada media, ditandai dengan pertumbuhan spora berbentuk seperti kapas atau miselium yang berwarna putih hingga hijau dan menyelimuti media maupun eksplan. Kontaminasi jamur biasanya mulai muncul pada hari kelima hingga ketujuh setelah proses penanaman, terutama jika sumber kontaminasinya berasal dari luar. Eksplan daun cenderung lebih mudah terkena kontaminasi karena pada daun terdapat stomata dan permukaan epidermis yang memungkinkan kontaminan seperti jamur dan bakteri masuk (Handayani *et al.*, 2022).

Pada kontaminasi bakteri, awalnya terlihat terbentuknya lapisan tipis bening di media, yang lama-kelamaan berubah menjadi putih kekuningan (Shofiyani *et al.*, 2020). Timbulnya lendir berwarna putih kekuningan di permukaan media dan sebagian lainnya tampak sebagai gumpalan basah yang menempel pada media (Wati *et al.*, 2020). Bakteri yang sering menjadi sumber kontaminasi pada kultur jaringan tumbuhan meliputi berbagai genus, antara lain *Bacillus*, *Lactobacillus plantarum*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, dan *Staphylococcus* (Wulandari, 2022).



Gambar 1. Eksplan terkontaminasi jamur



Gambar 2. Eksplan terkontaminasi Bakteri

Persentase Eksplan Terkontaminasi

Hasil uji *Kruskal Wallis* (Tabel 4) mengindikasikan bahwa pola sterilisasi berpengaruh signifikan terhadap persentase eksplan yang mengalami kontaminasi. Selanjutnya, uji lanjut *Mann Whitney* (Tabel 5) menunjukkan bahwa perbedaan persentase kontaminasi hanya bersifat signifikan ($P < 0,05$) pada kombinasi P1 dan P5, P2 dan P5, P3 dan P4, serta P4 dan P5.

Tabel 4. Hasil uji *Kruskal Wallis* persentase kontaminasi

<i>Kruskal Wallis H</i>	df	Asymp. Sig.
15,915	4	0.003

Tabel 5. Hasil uji *Mann Whitney* persentase kontaminasi

Perlakuan	Rerata
Pola 1 (P1)	0,40 ± 0,50 ab
Pola 2 (P2)	0,47 ± 0,51 ab
Pola 3 (P3)	0,13 ± 0,35 c
Pola 4 (P4)	0,67 ± 0,48 a
Pola 5 (P5)	0,07 ± 0,25 c

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

Tabel 6. Persentase kontaminasi

Pola sterilisasi	Persentase
Pola 1 (P1)	40%
Pola 2 (P2)	46,6%
Pola 3 (P3)	13,3%
Pola 4 (P4)	66,6%
Pola 5 (P5)	6,6%

Kontaminasi pada tanaman *in vitro* dianggap sebagai hambatan utama yang menghalangi keberhasilan dalam kultur jaringan. Kontaminasi dapat menghambat

pertumbuhan eksplan dalam kultur jaringan. Kontaminasi terjadi ketika lingkungan kultur terganggu akibat masuknya mikroorganisme seperti jamur dan bakteri. Eksplan daun cenderung lebih mudah terkena kontaminasi karena pada daun terdapat stomata dan permukaan epidermis yang memungkinkan kontaminan seperti jamur dan bakteri masuk (Handayani *et al.*, 2022). Kontaminasi juga dapat bersumber dari jaringan internal eksplan, yang tidak dapat dihilangkan hanya melalui sterilisasi permukaan, misalnya keberadaan bakteri endofit. Kondisi lingkungan *in vitro* yang kaya sukrosa dan nutrisi, disertai suhu hangat serta kelembaban tinggi, menjadi faktor yang sangat mendukung pertumbuhan cepat mikroorganisme. Situasi ini pada akhirnya menghambat perkembangan eksplan, bahkan dapat menyebabkan kematian jaringan tanaman (Chika *et al.*, 2022).

Berdasarkan hasil penelitian Pola sterilisasi P4 menunjukkan persentase tertinggi dalam persentase kontaminasi, sebesar 66,6%. Sementara itu, P5 memiliki persentase eksplan terkontaminasi terendah sebesar 6,6%. Dengan demikian, P5 sebagai pola sterilisasi paling efektif dalam menekan persentase eksplan terkontaminasi. Bahan sterilan yang digunakan pada pola sterilisasi P5 meliputi pencucian detergen cair, perendaman bakterisida agrept, fungisida benlate, tween 20, bayclin bertingkat (10%, 20%, dan 30%), alkohol 70% dan asam askorbat.

Berdasarkan hasil pengamatan pada pengaruh pola sterilisasi terhadap eksplan yang mengalami kontaminasi bakteri, penggunaan agrept dan agrimycin dapat menekan kontaminasi bakteri. Eksplan yang mengalami kontaminasi bakteri hanya terlihat pada P2 dan P4. sementara P1, P3 dan P5 tidak ditemukan koloni bakteri pada eksplan yang terkontaminasi. 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% pada eksplan daun kopi Arabika. Agrept adalah bakterisida yang mengandung bahan aktif streptomisin sulfat 20% yang efektif bersifat toksik terhadap bakteri. Menurut Asmono *et al.* (2021) penerapan pola sterilisasi yang disertai tambahan bakterisida Agrept mampu menekan kontaminasi bakteri hingga 0% pada eksplan daun kopi Arabika varietas Andungsari.

Fungisida benlate menunjukkan efektivitas yang lebih baik dalam menekan pertumbuhan jamur, yang menjadi kontaminan dominan pada kultur *in vitro* eksplan daun kopi Arabika Sidikalang, dibandingkan dengan fungisida lain. Hal ini ditunjukkan pada perlakuan P3, di mana eksplan direndam dalam larutan benlate selama 20 menit, serta pada perlakuan P5 dengan perendaman selama 30 menit. Persentase kontaminasi pada P3 tercatat sebesar 13,3%, yang merupakan nilai terendah kedua setelah P5. Pola sterilisasi P5 menggunakan kombinasi Agrept dan Benlate sebagai fungisida dan bakterisida efektif dalam menekan kontaminasi pada eksplan daun kopi Arabika Sidikalang. Benlate yang mengandung bahan aktif benomil 50% merupakan fungisida sistemik yang secara spesifik mengganggu proses mitosis pada β -tubulin serta pembelahan sel. Senyawa benomil bersifat eradikan karena mampu menghambat perkembangan miselium, baik sebelum maupun setelah infeksi terjadi. Sementara itu, Agrept kandungan bahan aktif streptomisin sulfat 20% yang efektif bersifat toksik terhadap bakteri. sehingga pertumbuhannya dapat terhambat (Widiastuti *et al.*, 2014).

Perendaman eksplan menggunakan deterjen membunuh virus dan bakteri karena deterjen mengandung sodium lauryl sulfate (SLS), yang berperan dalam menghambat pertumbuhan berbagai mikroorganisme. Penggunaan larutan Tween 20 sebagai surfaktan dalam proses sterilisasi dapat meningkatkan efektivitasnya, karena Tween 20 membantu bahan sterilan menembus jaringan tanaman dengan lebih

mudah (Sudiyanti *et al.*, 2017; Hamdani *et al.*, 2020). Alkohol merupakan senyawa kimia yang mengandung gugus fungsi -OH (Chika *et al.*, 2022). Dalam proses sterilisasi, alkohol yang paling umum digunakan adalah etanol (C_2H_5OH). Etanol dengan konsentrasi 70% maupun 90% sering diterapkan sebagai antiseptik dalam kultur jaringan. Penggunaan konsentrasi 70% terbukti mampu menekan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri (Lukmana & Rahmawati, 2018). Bayclin merupakan zat pemutih yang mengandung NaOCl 5–6%. Dalam kultur jaringan tanaman, NaOCl sering dimanfaatkan sebagai agen sterilisasi permukaan eksplan karena mampu menekan tingkat kontaminasi dari mikroorganisme, meskipun pada konsentrasi yang terlalu tinggi dapat bersifat fitotoksik dan merusak jaringan tanaman.

Dalam penelitian ini, pola sterilisasi P5 merupakan pola sterilisasi dengan persentase tingkat kontaminasi terendah, P5 menggunakan sterilisasi bertingkat dengan penggunaan konsentrasi dan durasi bahan sterilan yang berurutan, yakni perendaman bayclin 10%, bayclin 20%, serta bayclin 30%. Hasil yang didapat sesuai dengan pernyataan Chika *et al.* (2022) menyebutkan bahwa sterilisasi bertingkat merupakan salah satu upaya untuk mengurangi kontaminasi. Sterilisasi bertingkat merupakan suatu metode yang melakukan perendaman eksplan dengan bahan sterilan pada konsentrasi dan waktu berbeda secara berurutan.

Tingginya persentase kontaminasi pada Pola sterilisasi P4 disebabkan karena ketidaktepatan konsentrasi bahan sterilan yang digunakan, P4 adalah pola sterilisasi yang menerapkan bahan dengan konsentrasi rendah dan durasi perendaman yang relatif singkat, sehingga kemampuan untuk mengendalikan kontaminasi belum optimal. Hal ini sesuai dengan Ardiansyah *et al.* (2014) yang menyebutkan bahwa efektivitas sterilisasi sangat dipengaruhi oleh keseimbangan antara konsentrasi bahan sterilan dan lama waktu perendaman harus ditentukan secara empiris karena adanya sifat fitotoksik dari sterilan. Semakin rendah konsentrasi bayclin, maka akan semakin rentan pula eksplan terserang kontaminasi, sebaliknya jika konsentrasi bayclin yang diberikan terlalu tinggi maka perkembangan eksplan menjadi terhambat (Widiastuti *et al.*, 2018).

Persentase Eksplan Browning

Hasil uji *Kruskal Wallis* (Tabel 7) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata dari pola sterilisasi terhadap persentase eksplan yang mengalami *browning*. Uji lanjut *Mann Whitney* (Tabel 8) menunjukkan bahwa persentase eksplan yang mengalami *browning* hanya berbeda nyata ($P < 0,05$) pada P1 dan P3, P1 dan P4, P2 dan P3, P2 dan P4, P3 dan P5.

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

<i>Kruskal Wallis H</i>	df	Asymp. Sig.
25,475	4	< 0.001

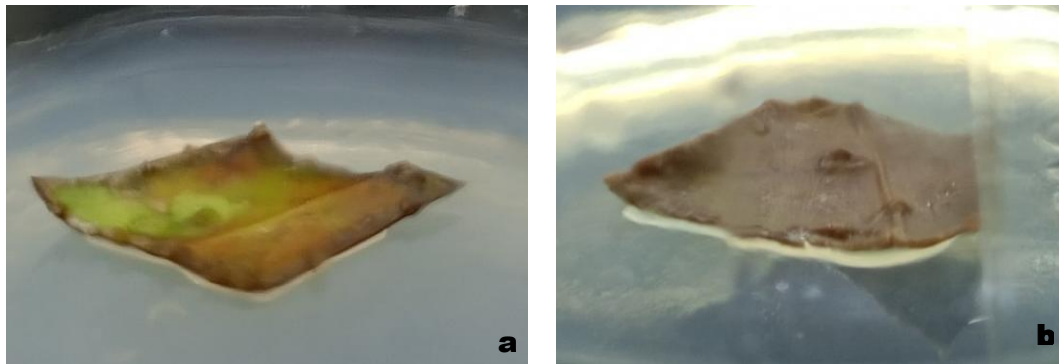
Tabel 8. Hasil uji *Mann Whitney* persentase eksplan *browning*

Perlakuan	Rerata
Pola 1 (P1)	0,00 ± 0,00a
Pola 2 (P2)	0,00 ± 0,00a
Pola 3 (P3)	0,60 ± 0,50c
Pola 4 (P4)	0,27 ± 0,45bc
Pola 5 (P5)	0,07 ± 0,25ab

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

Tabel 9. Persentase eksplan *browning*

Pola sterilisasi	Persentase
Pola 1 (P1)	0,00%
Pola 2 (P2)	0,00%
Pola 3 (P3)	60%
Pola 4 (P4)	26,6%
Pola 5 (P5)	6,66%

**Gambar 3.** Eksplan yang mengalami browning: (a) Eksplan menunjukkan gejala awal browning; (b) eksplan mengalami browning secara menyeluruh

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh nyata dari pola sterilisasi terhadap persentase eksplan yang mengalami *browning*. Pola sterilisasi P3 menunjukkan tingkat *browning* yang paling tinggi sebesar 60%. Sementara itu, pola sterilisasi P1, P2, dan P5 mampu menekan terjadinya *browning* pada eksplan daun kopi Arabika sehingga ketiga pola sterilisasi ini tidak menunjukkan perbedaan nyata satu sama lain, yang mengindikasikan bahwa ketiganya memiliki efektivitas yang serupa dalam menekan terjadinya *browning*.

Browning adalah perubahan warna jaringan tanaman menjadi coklat yang umum terjadi pada kultur in vitro, terutama pada eksplan. *Browning* pada eksplan lebih sering terjadi pada tanaman berkayu. Kopi Arabika, sebagai salah satu tanaman berkayu, memiliki kandungan senyawa fenol yang tinggi. Pemotongan eksplan saat penanaman merupakan bentuk stres mekanik yang dapat memicu respons fisiologis pada jaringan tanaman, termasuk aktivasi enzim polifenol oksidase dan peroksidase yang mengoksidasi senyawa fenolik menjadi quinin sehingga menimbulkan *browning*. Proses pencoklatan ini disebabkan oleh aktivitas enzim polifenol oksidase (PPO) yang mengoksidasi fenol menjadi senyawa berwarna coklat tersebut (Permadi *et al.*, 2023). Quinin yang terbentuk akibat oksidasi oleh enzim PPO, akan berikatan silang dengan protein atau mengalami polimerisasi dalam jaringan melalui serangkaian reaksi biokimia kompleks, yang akhirnya menghasilkan senyawa melanin yang berwarna gelap. Proses ini mengganggu metabolisme jaringan menghambat pertumbuhan, dan pada akhirnya menyebabkan pencoklatan serta kematian eksplan (Helena *et al.*, 2022). Visualisasi eksplan yang mengalami pencoklatan dalam penelitian ini dapat dilihat pada gambar 3.

Hasil penelitian yang menunjukkan pola sterilisasi P1, P2, dan P5 tidak menunjukkan perbedaan nyata satu sama lain, yang mengindikasikan bahwa ketiganya memiliki efektivitas yang serupa dalam menekan terjadinya *browning*. Penggunaan asam askorbat terbukti mampu mengendalikan *browning* pada eksplan. Hal ini sejalan dengan penelitian Tarampak *et al.* (2019) yang menunjukkan bahwa vitamin C (asam askorbat) pada konsentrasi 1 mg/L efektif mencegah *browning* pada

kultur in vitro eksplan ulin selama periode observasi 7 hari. Selain itu, Admojo dan Indrianto (2016) melaporkan bahwa eksplan daun karet (*Hevea brasiliensis*) yang direndam dalam larutan asam askorbat steril 100 mg/L selama 30 menit dan diinkubasi dalam kondisi gelap mengalami penurunan intensitas *browning* hingga 7,5%, dengan sekitar 30% eksplan menunjukkan gejala *browning*. Secara mekanisme, asam askorbat bekerja sebagai antioksidan melalui jalur enzimatik. Zat ini mereduksi o-quinon, yang bertindak sebagai oksidator, sehingga reaksi oksidasi-reduksi berlangsung lebih cepat dan mencegah pembentukan polimer o-quinon. Akibatnya, proses *browning* pada eksplan dapat diminimalkan (Chika *et al.*, 2020).

Pencoklatan (*browning*) pada eksplan tidak hanya disebabkan oleh pemilihan bahan sterilan yang kurang tepat atau proses sterilisasi yang berlebihan, tetapi juga dapat dipicu oleh beberapa faktor lain yang berkontribusi secara signifikan. *Browning* pada eksplan dapat dipicu oleh beberapa faktor, salah satunya adalah penggunaan bahan tanam dari jaringan dewasa yang tidak meristematik, karena kandungan fenoliknya yang tinggi membuatnya lebih rentan terhadap oksidasi. Kondisi media kultur yang tidak sesuai serta lingkungan kultur yang kurang optimal, seperti suhu, kelembaban, dan pencahayaan, juga dapat memicu terjadinya pencoklatan. Selain itu, aspek teknis selama penanaman berperan penting; misalnya, alat seperti pisau bedah (scalpel) dan pinset yang masih panas dapat menyebabkan luka pada jaringan eksplan, memicu aktivitas enzim polifenol oksidase (PPO) sehingga senyawa fenolik cepat teroksidasi menjadi pigmen coklat. Waktu pengeringan eksplan yang terlalu lama setelah sterilisasi juga meningkatkan risiko *browning* karena paparan oksigen lebih lama mempercepat reaksi oksidasi (Fitriani *et al.*, 2019). Pengendalian faktor-faktor tersebut sangat penting untuk menjaga viabilitas eksplan sekaligus meminimalkan pencoklatan dalam kultur jaringan.

Waktu Muncul Kalus

Hasil uji *Kruskal Wallis* (Tabel 10) menegaskan bahwa pola sterilisasi tidak memberikan pengaruh nyata terhadap waktu munculnya kalus dengan nilai sig.> 0,05.

Tabel 10. Hasil uji *Kruskal Wallis* waktu muncul kalus

<i>Kruskal Wallis H</i>	df	Asymp. Sig.
7,184	4	0,126

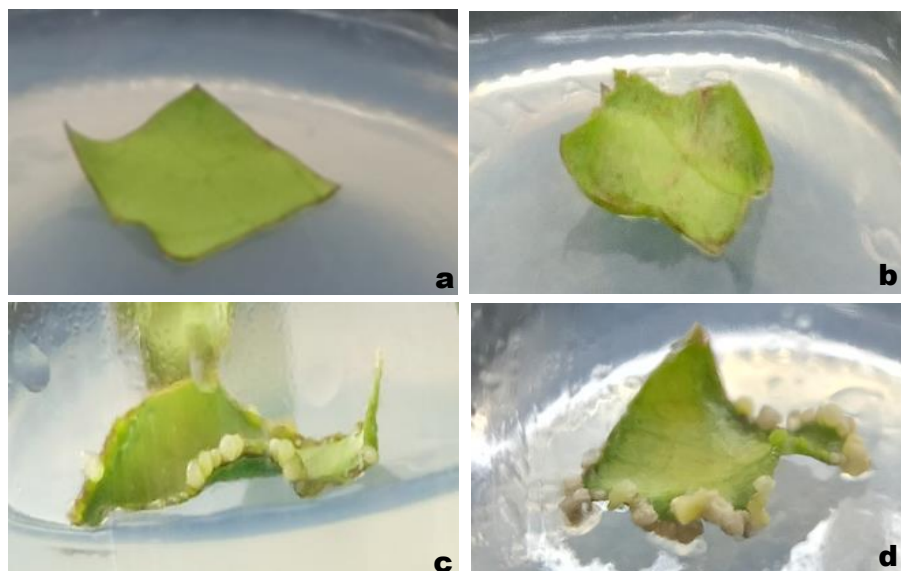
Waktu tercepat untuk munculnya kalus adalah 12 hst sementara waktu terlama 15 hst. Hal ini mengindikasikan bahwa perbedaan kombinasi bahan sterilan yang digunakan tidak secara signifikan mempengaruhi kecepatan respon eksplan membentuk kalus. Secara fisiologis, pembentukan kalus lebih dipengaruhi oleh kondisi internal eksplan dan komposisi media kultur, terutama kandungan hormon seperti auksin dan sitokinin dibandingkan pemberian pola sterilisasi. Dalam kultur jaringan, keberhasilan perbanyakan tanaman sangat bergantung pada peran zat pengatur tumbuh (Debitama *et al.*, 2022). Penggunaan kombinasi sitokinin dan auksin dapat memicu interaksi yang memengaruhi diferensiasi jaringan tanaman (Sulichantini *et al.*, 2021).

Bahan sterilan berfungsi utama untuk menghilangkan kontaminan, bukan untuk merangsang pertumbuhan jaringan, oleh karena itu meskipun pola sterilisasi menggunakan jenis bahan sterilan yang berbeda selama tidak menimbulkan fitotoksitas berlebih, tidak akan banyak mempengaruhi waktu munculnya kalus. Pada prinsipnya, bahan sterilisasi yang digunakan dalam kultur jaringan berpotensi bersifat toksik terhadap jaringan jika dosisnya tidak sesuai. Oleh karena itu, penggunaan bahan sterilan harus memperhatikan konsentrasi dan durasi perendaman, karena

selain mampu menghilangkan kontaminan, bahan sterilan juga berpotensi merusak atau membunuh eksplan (Shofiyani *et al.*, 2020). Dalam penelitian ini, keberhasilan pola sterilisasi yang diterapkan ditunjukkan melalui munculnya kalus pada eksplan.

Pada penelitian ini media yang digunakan adalah media $\frac{1}{2}$ MS dengan zat pengatur tumbuh 2,4-D sebagai auksin dan kinetin sebagai sitokinin, konsentrasi ZPT yang digunakan masing masing 1 ppm. Media setengah konsentrasi Murashige dan Skoog ($\frac{1}{2}$ MS) telah terbukti efektif dalam mendukung pembentukan kalus, sebagaimana pada penelitian Ibrahim *et al.* (2012) menggunakan media $\frac{1}{2}$ MS dengan modifikasi vitamin dari media B5 dan ditambah dengan ZPT 2,4D dan kinetin untuk memacu pembentukan kalus kopi Arabika. Penggunaan media $\frac{1}{2}$ MS tidak hanya menghemat penggunaan mineral, tetapi juga berkontribusi terhadap penurunan stres fisiologis pada eksplan, yang berdampak positif dalam mengurangi tingkat *browning* serta mendukung perkembangan kalus secara optimal (Asmono *et al.*, 2024).

Sebelum kalus terbentuk, eksplan akan mengalami fase awal berupa pembengkakan jaringan. Fase pembengkakan ini menandakan bahwa sel-sel eksplan mulai merespons media kultur dan zat pengatur tumbuh dengan aktif, menunjukkan interaksi fisiologis yang berlangsung di lingkungan *in vitro* (Okao *et al.*, 2025). Respons ini umumnya terjadi pada area yang mengalami luka, karena bagian tersebut memiliki aktivitas metabolik yang tinggi dan lebih peka terhadap stimulasi hormonal. Setelah fase pembengkakan, kalus biasanya mulai terbentuk dari tepi atau area luka pada eksplan, terutama di bagian pinggir daun, di mana sel-sel mengalami dediferensiasi dan membelah secara tidak teratur untuk membentuk jaringan kalus.



Gambar 4. Waktu muncul kalus (a) eksplan setelah inisiasi (b) eksplan membengkak (c) eksplan berkalus 14 hst (d) eksplan berkalus 30 hst

Persentase Eksplan Berkalus

Berdasarkan (Tabel 11), uji *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa pola sterilisasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap persentase eksplan yang membentuk kalus. Karena adanya pengaruh tersebut, dilakukan uji lanjut *Mann Whitney* (Tabel 12), yang mengungkapkan bahwa persentase eksplan membentuk kalus berbeda secara signifikan ($P < 0,05$) pada kombinasi perlakuan P2 dan P4, P3 dan P5, serta P4 dan P5. Sebaliknya, pola sterilisasi P1, P2, dan P3 tidak menunjukkan perbedaan signifikan satu sama lain.

Tabel 11. Hasil uji *Kruskal Wallis* persentase eksplan membentuk kalus

Kruskal Wallis H	df	Asymp. Sig.
13,535	4	0,009

Tabel 12. Hasil uji *Mann Whitney* persentase eksplan membentuk kalus

Perlakuan	Rerata
Pola 1 (P1)	0,60 ± 0,50 ac
Pola 2 (P2)	0,73 ± 0,45 ac
Pola 3 (P3)	0,47 ± 0,51 ab
Pola 4 (P4)	0,33 ± 0,48 b
Pola 5 (P5)	0,93 ± 0,25 c

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

Tabel 13. Persentase eksplan membentuk kalus

Pola sterilisasi	Persentase
Pola 1 (P1)	60%
Pola 2 (P2)	73,3%
Pola 3 (P3)	46,6%
Pola 4 (P4)	33,3%
Pola 5 (P5)	93,3%

Berdasarkan tabel persentasi eksplan membentuk kalus pada (tabel 13), pola sterilisasi P5 menunjukkan persentase tertinggi dalam pembentukan kalus sebesar 93,3%. Sementara itu, P4 memiliki persentase pembentukan kalus yang terendah yaitu sebesar 33,3%. Dengan demikian, P5 sebagai pola sterilisasi paling efektif mendukung pembentukan kalus secara optimal.

Pengamatan persentase eksplan membentuk kalus merupakan salah satu indikator berhasilnya pola sterilisasi yang dilakukan. Persentase eksplan membentuk kalus berhubungan dengan persentase eksplan terkontaminasi dan persentase eksplan *browning*. Semakin tinggi persentase kontaminasi dan *browning*, semakin rendah peluang pembentukan kalus karena sebagian besar eksplan nya mati. Pola sterilisasi P4, merupakan pola sterilisasi dengan persentase eksplan membentuk kalus terendah, karena, persentase kontaminasi yang tinggi sebesar 66,6%, sementara P3 persentase eksplan *browning* nya tertinggi yaitu sebesar 60%. Pola sterilisasi P4 belum cukup optimal dalam menekan pertumbuhan kontaminan, dikarenakan pemilihan bahan sterilan yang belum tepat, sementara P3, sudah cukup optimal dalam menekan kontaminan, namun karena sterilisasinya berlebihan mengakibatkan eksplan mengalami *browning* sehingga pembentukan kalus pada eksplan terganggu.

Kalus merupakan kumpulan jaringan tanaman yang belum mengalami diferensiasi (amorf) dan terbentuk akibat pembelahan sel yang tidak terorganisir, yang biasanya dipicu oleh luka pada jaringan eksplan. Kalus memiliki peranan penting dalam regenerasi tanaman karena setiap selnya memiliki kemampuan totipotensi, yaitu potensi untuk berkembang menjadi individu baru. Selain itu kalus dapat dibentuk dari hampir semua jenis jaringan tanaman (Khalida *et al.*, 2019).

Sebelum terbentuknya kalus, eksplan umumnya mengalami fase awal berupa pembengkakan jaringan. Pembengkakan ini merupakan respons fisiologis awal dari eksplan terhadap media, yang menunjukkan bahwa sel-sel eksplan telah mulai berinteraksi aktif dengan lingkungan *in vitro*. Respon ini umumnya terjadi di area yang mengalami luka, karena bagian tersebut memiliki aktivitas metabolik yang tinggi dan lebih responsif terhadap stimulasi hormonal. Setelah fase pembengkakan,

pembentukan kalus biasanya dimulai dari area tepi atau luka pada eksplan, terutama pada bagian pinggir daun, tempat sel-sel dediferensiasi dan membelah secara tidak terorganisir membentuk jaringan kalus. Keberhasilan proses ini sangat dipengaruhi oleh kondisi fisiologis eksplan, khususnya jika jaringan yang digunakan masih bersifat meristematik. Bagian tumbuhan dengan sel yang aktif membelah menjadi sumber eksplan yang paling ideal (Khalida *et al.*, 2019). Selain itu, zat pengatur tumbuh dalam media kultur, seperti auksin dan sitokinin, membantu merangsang pembelahan sel dan pertumbuhan kalus, sehingga penutupan luka pada eksplan dapat terjadi secara efektif.

Dalam kultur jaringan, kalus yang dianggap ideal umumnya berwarna putih dan memiliki tekstur remah (*friable*). Kalus dengan tekstur remah memiliki struktur sel yang longgar, mudah terurai menjadi unit sel tunggal, serta ruang antar sel yang luas disertai kadar air tinggi. Sifat tersebut sangat menguntungkan karena mendukung perbanyakan kalus melalui teknik kultur suspensi, sehingga memungkinkan produksi biomassa sel dalam jumlah besar (Wahyuni *et al.*, 2020; Okao *et al.*, 2025). Kehadiran warna putih pada kalus menandakan bahwa sel-sel berada dalam fase pembelahan aktif. Selain itu, warna ini mengindikasikan bahwa plastida belum terdiferensiasi sehingga sifat sel masih meristematik atau embriogenik. Kalus putih umumnya memiliki kapasitas embriogenik yang tinggi, sehingga berpotensi berkembang menjadi embrio somatik melalui proses embriogenesis somatik (Sulichantini *et al.*, 2021).

Dalam penelitian ini, kalus yang terbentuk pada eksplan menunjukkan perkembangan bertahap, dimulai dari kalus berwarna putih pada 14 hst hingga mengalami perubahan warna menjadi putih kekuningan pada 30 hst, dengan tekstur bervariasi dari remah hingga intermediet (Gambar 4). Perubahan warna dari putih ke putih kekuningan dapat diinterpretasikan sebagai tanda adanya diferensiasi awal dan transisi menuju sifat embriogenik. Kalus putih biasanya tersusun atas sel-sel embriogenik yang masih belum memiliki kloroplas, namun kaya akan butiran pati sebagai cadangan energi yang sangat penting dalam proses embriogenesis (Wahyuni *et al.*, 2020).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pola sterilisasi berpengaruh secara signifikan terhadap waktu munculnya kontaminasi, persentase eksplan terkontaminasi, persentase eksplan *browning*, dan persentase eksplan membentuk kalus. Sementara untuk parameter waktu munculnya kalus pola sterilisasi yang diberikan tidak berpengaruh secara signifikan. Hal ini mengindikasikan meskipun pola sterilisasi menentukan persentase pembentukan kalus, faktor lain seperti karakteristik eksplan, kondisi media kultur, penggunaan ZPT lebih dominan dalam menentukan waktu awal kemunculan kalus. Pola sterilisasi yang optimal dalam menekan kontaminasi pada kultur *in vitro* eksplan daun kopi Arabika Sidikalang yaitu pola sterilisasi P5, hal ini dibuktikan dengan persentase eksplan membentuk kalus dari pola 5 adalah yang tertinggi yaitu 93,3%, persentase eksplan yang mengalami kontaminasi sebesar 6,66%, persentase eksplan yang mengalami *browning* 6,66%. Pola sterilisasi 5 mencakup, di luar LAFC: dicuci dengan detergen cair, direndam dalam agrest 2 gr/L selama 30 menit, benlate 2 gr/L selama 30 menit, dan dibilas dengan air mengalir. Kemudian di dalam LAFC direndam tween 20 (5 tetes/100 ml) selama 20 menit, bayclin 10% selama 20 menit, bayclin 20% selama 15 menit, bayclin 30% selama 5 menit, alkohol 70% selama 20 detik, serta asam askorbat 100 mg/100 ml selama 20 menit.

REKOMENDASI

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penulis menyarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai, pembentukan kalus dari eksplan daun kopi Arabika hingga menjadi planlet.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada pihak-pihak yang membantu pelaksanaan penelitian ini. Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih kepada dosen pembimbing yang telah memberi arahan dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Admojo, L., & Indrianto, A. (2016). Pencegahan browning fase inisiasi kalus pada kultur midrib daun klon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) PB 330. *Jurnal Penelitian Karet*, 34(1), 25–34.
- Ardiansyah, R., Sekar Wulandari, A., Subandy, B., & Fitriani, Y. (2014). Explant sterilization and shoot induction techniques in micropropagation of tembesu (*Fagraea fragrans* Roxb.). *Jurnal Silvikultur Tropika*, 5(3), 167–173.
- Asmono, S. L., Rahmawati, Husna, H., Sulala, A., Auliya, S., & 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.
- Asmono, S. L., Wardana, R., & Rahmawati. (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.
- Asni Setiani, N., Nurwinda, F., & Astriany, D. (2018). Pengaruh desinfektan dan lama perendaman pada sterilisasi eksplan daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson ex F. A. Zorn) Fosberg). *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 6(3), 78–82.
- Asosiasi Eksportir dan Industri Kopi Indonesia. (2025). Industri kopi. <https://www.aekiaice.org/industri-kopi/>
- Chika, S., Ismaini, L., & Armanda, D. T. (2022). Explant sterilization technique *Castanopsis argentea* (Blume) A.DC. with the addition of ascorbic acid and sodium hypochlorite (NaOCl) in vitro. *Berkala Ilmiah Biologi*, 13(2), 32–41.
- Debitama, A. N., Mawarni, I., & Hasanah, U. (2022). Pengaruh hormon auksin sebagai zat pengatur tumbuh pada beberapa jenis tumbuhan monocotyledoneae dan dicotyledoneae. *Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*, 17(1), 120–130.
- Fitriani, Y., Wijana, G., & 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.
- Hamdani, S., Rahayu, R., & Yusnita. (2020). Teknik sterilisasi eksplan tunas kentang Granola (*Solanum tuberosum* L.) untuk kultur in vitro. *Jurnal Ilmiah Agrotek Tropika*, 8(3), 357–366.
- Handayani, A. T., Sandra, E., & Faizah, H. (2022). Optimasi sterilisasi eksplan daun tanaman lidah mertua (*Sansevieria* sp.) pada kultur in vitro. *Bioscientist: Jurnal Ilmiah Biologi*, 10(1), 109–124.
- Hapsoro, D., & Yusnita, Y. (2018). *Kultur jaringan: Teori dan praktik*. Yogyakarta: Penerbit ANDI.
- Harahap, F., Bangun, E. F., Suriani, C., Edi, S., Ningsih, A. P., & Nusyirwan. (2023). Variasi waktu dan sterilisasi untuk anggrek *Cattleya* sp. sebelum penanaman in vitro. *Best Journal (Biology Education, Sains and Technology)*, 6(2), 492–498.

- Harahap, F., Hasanah, A., Insani, H., Harahap, N. K., Pinem, M. D., Edi, S., Siahaan, H., & Silaban, R. (2019). *Kultur jaringan nanas*. Penerbit Media Sahabat Cendekia.
- 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.
- Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. S., Rubiyo, Purwito, A., & Sudarsono. (2013). Induksi kalus embriogenik dan daya regenerasi kopi arabika menggunakan 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dan 6-benzyladenine. *Buletin RISTRI*, 4(2), 91–98.
- Ibrahim, M. S. D., Sudarsono, Rubiyo, & Syafaruddin. (2012). Pengaruh komposisi media terhadap pembentukan kalus embriogenesis somatik kopi arabika (*Coffea arabica*). *Buletin RISTRI*, 3(1), 13–22.
- Khalida, A., Suwirmen, & Noli, Z. A. (2019). Induksi kalus anggrek lilin (*Aerides odorata* Lour.) dengan pemberian beberapa konsentrasi 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D). *Jurnal Biologi Universitas Andalas*, 7(2), 109–117.
- Kurniawan, W. M., & Hastuti, K. (2017). Penentuan kualitas biji kopi arabika dengan menggunakan analytical hierarchy process (studi kasus pada perkebunan kopi lereng Gunung Kelir Jambu Semarang). *Simetris: Jurnal Teknik Mesin, Elektro dan Ilmu Komputer*, 8(2), 519–528.
- Lukmana, M., & Rahmawati, L. (2018). Sterilization effectiveness of rubber leaf explant (*Hevea brasiliensis*) in in vitro culture. *Bioprospek: Jurnal Ilmiah Biologi*, 13(1), 19–25.
- Okao, M., Bharati, R., & Fernández-Cusimamani, E. (2025). Effect of explant physiology and media composition on callogenesis of *Vitellaria paradoxa* leaf explants. *Horticulturae*, 11(9), 1127.
- Oratmangun, K. M., Pandiangan, D., Febby, E., & Kandou, F. E. (2017). Deskripsi jenis-jenis kontaminan dari kultur kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Jurnal MIPA Unsrat Online*, 6(1), 47–52.
- Permadi, N., Nurzaman, M., Alhasnawi, A. N., Doni, F., & Julaeha, E. (2023). Managing lethal browning and microbial contamination in *Musa* spp. tissue culture: Synthesis and perspectives. *Horticulturae*, 9(4), 453.
- Saepudin, A., Yulianto, Y., & Aeni, R. N. (2020). Pertumbuhan eksplan in vitro anggrek hibrida *Dendrobium* pada beberapa media dasar dan konsentrasi air kelapa. *Media Pertanian*, 5(2), 97–115.
- Shofiyani, A., & Damajanti, N. (2015). Pengembangan metode sterilisasi pada berbagai eksplan guna meningkatkan keberhasilan kultur kalus kencur (*Kaempferia galanga* L.). *Agritech*, 17(2), 64–72.
- Shofiyani, A., Purnawanto, A. M., Zahara, R., & Aziz, A. (2020). Pengaruh berbagai sterilan dan waktu perendaman terhadap keberhasilan sterilisasi eksplan daun kencur (*Kaempferia galanga* L.) pada teknik kultur in vitro. *Agritech*, 12(1), 30–39.
- Sinaga, A., Sianturi, C. M., & Pasaribu, V. A. R. (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.
- Sudiyanti, S., Rusbana, T. B., & Susiyanti, S. (2017). Inisiasi tunas kokoleceran (*Vatica bantamensis*) pada berbagai jenis media tanam dan konsentrasi BAP (benzyl amino purine) secara in vitro. *Jurnal Agro*, 4(1), 1–14.
- Sulichantini, E. D., Eliyani, Saputra, A., Nazari, A. P. D., & Susylowati. (2021). Pengaruh zat pengatur tumbuh dan bahan organik terhadap pertumbuhan

- anggrek tebu (*Grammatophyllum speciosum* Blume) secara kultur jaringan. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika Lembab*, 4(1), 13–19.
- Sulichantini, E. D., Nazari, A. P. D., & Nuansyah, A. (2024). Identifikasi kontaminasi kultur jaringan pisang Cavendish. *Jurnal Agrotek Tropika*, 12(2), 400–409.
- Supriadi, H., Ferry, Y., & Ibrahim, M. S. D. (2018). *Teknologi budi daya tanaman kopi* (Edisi revisi). IAARD Press.
- Tarampak, T. C., Sulistiawati, & Nirmala, R. (2019). Metode mengatasi browning pada eksplan ulin (*Eusideroxylon zwageri*) untuk inisiasi regenerasi secara in vitro. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika Lembab*, 1(2), 106–117.
- Tarigan, R. B. R., & Karo Karo, R. P. P. (2024). Musyawarah desa sebagai komunikasi pembangunan yang efektif untuk memajukan badan usaha milik desa (BUMDes) tanaman kopi di Kecamatan Sidikalang, Kabupaten Dairi, Provinsi Sumatera Utara. *Jurnal Lemhannas RI*, 10(4), 41–50.
- Wahyuni, D. K., Huda, A., Faizah, S., Purnobasuki, H., & Wardoyo, B. P. E. (2020). Effects of light, sucrose concentration, and repetitive subculture on callus growth and medically important production in *Justicia gendarussa* Burm. f. *Biotechnology Reports*, 27, e00473.
- Wati, T., Astarini, I. A., Pharmawati, M., & Hendriyani, E. (2020). Perbanyak *Begonia bimaensis* Undaharta & Ardaka dengan teknik kultur jaringan. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 7(1), 112–122.
- Widiastuti, A., Agustina, W., Wibowo, A., & Sumardiyono, C. (2014). Uji efektivitas pestisida terhadap beberapa patogen penyebab penyakit penting pada buah naga (*Hylocereus* sp.) secara in vitro. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 18(1), 1–8.
- Widiastuti, Y., Bariyyah, K., Istianingrum, P., Restanto, D. P., & Hartatik, S. (2018). In vitro sterilization method of the Banyuwangi's local red durian leaf explants to several combination types of sterilization materials. *International Journal of Agriculture, Environment and Bioresearch*, 3(5), 262–273.
- Wulandari, E. (2022). Identifikasi bakteri kontaminan pada kultur jaringan bambu jenis *Fargesia scabrida*. *Integrated Lab Journal*, 10(2), 99–107.