

Optimasi Metode Sterilisasi Eksplan Daun Kopi Arabika (*Coffea Arabica L.*) dan Robusta (*Coffea Canephora Var. Robusta chev.*) secara In Vitro

*Optimization of Sterilization Methods in Vitro of Arabica (*Coffea Arabica L.*) and Robusta (*Coffea Canephora Var. Robusta Chev.*) Leaf Exsplants*

Sepdian Luri Asmono #1, Rudi Wardana #2, Rahmawati #3

#Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember, Jln. Mastrip No. 164 Jember
¹sepdian@polije.ac.id

ABSTRAK

Salah satu metode perbanyak tanaman kopi (*Coffea sp*) untuk mendapatkan bibit unggul melalui metode kultur jaringan adalah dengan teknik Somatic Embryogenesis (SE). Tetapi permasalahan yang sering terjadi adalah adanya kontaminasi pada eksplan. Kontaminasi dapat menghambat proses pertumbuhan sehingga eksplan tidak dapat tumbuh atau mati. Solusi yang dapat dilakukan untuk mengurangi tingkat kontaminasi adalah dengan optimalisasi teknik sterilisasi eksplan. Oleh sebab itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui metode sterilisasi yang optimal untuk mendapatkan eksplan steril dari 2 jenis tanaman kopi yang diujikan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember. Penelitian ini disusun menggunakan rancangan acak lengkap faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah 2 jenis klon kopi yaitu Arabica Andungsari dan Robusta BP 308. Faktor kedua adalah 3 metode sterilisasi. Dengan demikian, penelitian ini terdiri dari 6 perlakuan dan akan diulang sebanyak 5 kali. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode sterilisasi 1 optimal dalam menekan kontaminasi dan juga browning. Kopi robusta BP 308 lebih responsif dalam pembentukan kalus dengan rata-rata munculnya kalus yaitu 11 hari setelah inokulasi.

Kata kunci — Kata Kunci : Kopi, Sterilisasi, Eksplan, Kultur Jaringan

ABSTRACT

*One of the recommended clonal seeds of the coffee plant (*Coffea sp*) was obtained through the Somatic embryogenesis method in plant tissue culture techniques. Especially for coffee, tissue culture method is used to produce Somatic Embryogenesis (SE) seedlings. The presence of contamination in the explants can inhibit the growth process so that the explants cannot grow or die. The solution that can be done to reduce the level of contamination is to sterilize the explants. Therefore, the purpose of this study was to determine the optimal sterilization method to obtain sterile explants of 2 types of coffee plants tested. This research was at the Plant Tissue Culture Laboratory, Department of Agricultural Production, Politeknik Negeri Jember. This study was arranged using a factorial completely randomized design with 2 factors. The first factor is 2 types of coffee clones, namely Arabica Andungsari and Robusta BP 308. The second factor is 3 methods of sterilization. Thus, this study consisted of 6 treatments and would be repeated 5 times. From the results of this study it can be concluded that sterilization method 1 is optimal in suppressing contamination and also browning. Robusta coffee BP 308 was more responsive in callus formation with an average callus appearance of 11 days after inoculation*

Keywords— *Coffee, Sterilization, Explants, Tissue Culture*

1. Pendahuluan

Tanaman Kopi (*Coffea sp*) merupakan salah satu tanaman komoditas unggulan di Indonesia. Berdasarkan data Dirjen Perkebunan tahun 2019, produktivitas kopi Indonesia rata-rata sekitar 700 ribu ton per tahun atau sekitar 9% dari produksi kopi dunia [1]. Oleh sebab itu Indonesia saat ini menduduki nomor keempat setelah Brasil, Vietnam dan Kolombia. Selain itu, buah kopi juga memiliki peran yang sangat penting sebagai pemasukan devisa Negara karena bernilai ekspor tinggi. Salah satu sentra kopi Indonesia adalah Jawa Timur, khususnya daerah Tapal Kuda (Jember, Bondowoso, Situbondo, Lumajang, Pasuruan, Probolinggo, Banyuwangi). Khusus daerah Jember-Bondowoso memiliki kopi Robusta dan Arabika yang khas dan merupakan komoditas ekspor daerah.

Seiring dengan meningkatnya pesanan kopi dunia, hal utama yang perlu dikuatkan adalah regenerasi tanaman kopi unggul. Namun permasalahan yang sering muncul yaitu sulitnya mendapatkan bibit kopi Robusta dan Arabika yang berkualitas unggul. Dengan permasalahan tersebut hal yang dapat dilakukan adalah melakukan teknik baru yang inovatif perbanyak dengan cara teknik kultur jaringan. Pengembangan bibit kopi unggul melalui kultur jaringan juga dapat menjadi salah satu potensi untuk dikembangkan menjadi Teaching Factory di Politeknik Negeri Jember.

Teknik kultur jaringan atau kultur *in vitro* akhir-akhir ini banyak digunakan pada berbagai jenis tanaman salah satunya untuk jenis tanaman kopi. Teknik kultur jaringan merupakan teknik perbanyak tanaman dengan cara mengisolasi bagian tubuh atau organ (sel atau jaringan) dari tanaman dan ditumbuhkan dalam kondisi steril atau aseptik yang dapat tumbuh menjadi tanaman yang utuh. Keunggulan dari teknik ini yaitu menghasilkan tanaman yang memiliki sifat yang sama atau identik dengan induknya, menghasilkan bibit dengan jumlah yang besar dalam waktu yang relatif singkat [2], [3]. Khusus untuk kopi, metode kultur jaringan digunakan untuk menghasilkan bibit Somatic Embryogenesis (SE) [4][5]. Sel-sel dari 1 potong daun ukuran 1cm², mampu berkembang menjadi ratusan embrio somatik yang nantinya masing-

masing akan menjadi bibit yang memiliki sifat identik dengan induknya.

Namun adapun masalah yang sering muncul atau sering dijumpai di dalam kultur jaringan salah satunya yaitu adanya kontaminasi pada eksplan yang dapat menghambat proses pertumbuhan sehingga eksplan tidak dapat tumbuh atau mati. Permasalahan tersebut timbul karena eksplan yang diinokulasikan tidak steril. Solusi yang dapat dilakukan untuk mengurangi tingkat kontaminasi adalah dengan melakukan sterilisasi pada eksplan.

Sterilisasi pada eksplan bertujuan untuk mencegah atau membunuh mikroorganisme yang kemungkinan terbawa atau menempel di daun pada saat pengambilan eksplan. Ada beberapa sterilisasi yang digunakan oleh peneliti terdahulu diantaranya, yaitu sterilisasi dengan direndam larutan fungisida dithane dan bakterisida agrimycin, mencelupkan ke dalam alkohol 50% dan direndam larutan NaOCl 5,25% [6]. Kemudian pada penelitian lainnya ada yang mencuci eksplan dengan detergen cair, direndam larutan fungisida dithane 2 gr/L, dicelupkan ke dalam alkohol 70% dan direndam larutan bayclin [7]. Dalam aplikasinya, metode sterilisasi dari penelitian yang dilakukan belum secara optimal mendapatkan eksplan steril apalagi jika berbeda jenis eksplan dan asal eksplan. Dalam penelitian ini peneliti akan menggunakan kopi Arabika Klon Andungsari dan Robusta Klon BP 308. Oleh karena itu, penulis ingin melakukan penelitian menguji dan mengoptimasi beberapa metode sterilisasi eksplan daun kopi, agar dapat memperoleh metode sterilisasi yang cocok untuk keberhasilan kultur eksplan kopi Arabika dan Robusta secara *in vitro* khususnya asal eksplan daerah jember.

2. Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni s.d November 2021 di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember.

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini yaitu bibit kopi umur 7-8 bulan klon Andungsari dan Klon BP308, media dasar MS, ZPT 2,4 D, Kinetin, PVP, sukrosa, alkohol 70% dan 96%, kertas steril, HgCL₂, NaOCl 5,25%, karet, spirtus, fungisida dithane,



bakterisida agrimycin, bayclin, erytromycin, detergen bubuk, detergen cair dan kertas label.

Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah 2 jenis klon kopi yaitu Arabika Andungsari dan Robusta BP 308. Faktor kedua yaitu 3 metode sterilisasi. Dengan demikian, penelitian ini terdiri dari 6 perlakuan dan akan diulang sebanyak 5 kali.

Table 1. Metode sterilisasi eksplan daun kopi

Metode	Bahan Sterilisasi	Konsentrasi	Lama Perendaman
METODE 1	Detergen cair	2 ml/L	10 menit
	Bilas aquadest steril 3 x		1 menit
	Dithane	2 gr/L	20 menit
	Agrept	2 gr/L	
	Erytomycin	4 gr/L	
	Bilas aquadest steril 3 x		1 Menit
	Alkohol	70%	3 detik
	Bilas aquadest steril 3 x		1 Menit
	Bayclin (NaOCl 5,25%)	10%	10 menit
	Bayclin (NaOCl 5,25%)	20%	10 menit
Bilas aquadest steril 3 x		1 Menit	
METODE 2	Detergen cair	2 ml/L	10 menit
	Bilas aquadest steril 3 x		1 menit
	Alkohol	70%	3 detik
	Bilas aquadest steril 3 x		1 Menit

HgCL ₂	0,1%	5 menit
Bilas aquadest steril 3 x		1 menit
Detergen cair	2 ml/L	10 menit
Bilas aquadest steril 3 x		1 menit
Dithane	2 gr/L	20 menit
Agrept	2 gr/L	
Erytomycin	4 gr/L	
Bilas aquadest steril 3 x		1 menit
Alkohol	70%	3 detik
Bilas aquadest steril 3 x		1 menit
METODE 3		
Bayclin (NaOCl 5,25%)	10%	10 menit
Bayclin (NaOCl 5,25%)	20%	10 menit
Bilas aquadest steril 3 x		1 menit
HgCL ₂	0,1%	5 menit
Bilas aquadest steril 3 x		1 menit

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Persentase Kontaminasi Cendawan

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan uji Anova menunjukkan bahwa tingkat kontaminasi pada kedua faktor yaitu jenis klon kopi dan metode sterilisasi tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga jenis metode sterilisasi yang digunakan mampu menekan kontaminasi yang disebabkan oleh cendawan, dimana rata-rata kontaminasi cendawan seperti pada Tabel 1 menunjukkan persentase yaitu sebesar 6 % sampai 12 % saja. Sehingga untuk melakukan sterilisasi ekplan



daun kopi direkomendasikan menggunakan metode 1 atau metode sterilisasi yang paling ringan. Hal ini dikarenakan penggunaan bahan sterilan yang kuat akan menyebabkan kematian pada jaringan/ sel pada eksplan. Hal ini sejalan dengan pernyataan [17] menyatakan bahwa bahan sterilan tidak hanya menghilangkan kontaminasi, akan tetapi juga dapat berakibat kematian pada eksplan.

Table 2. Rerata Kontaminasi Cendawan

PERLAKUAN	RERATA
1RO	6.25 %
1BI	6.25%
2RO	6.25%
2BI	0%
3RO	12.5%
3BI	6.25%

Keterangan = 0% menunjukkan bahwa tidak terdapat kontaminasi yang disebabkan oleh cendawan.

3.2. Saat Muncul Cendawan

Kontaminasi yang disebabkan oleh cendawan biasanya memiliki ciri terdapat serat halus berwarna putih disekitar permukaan media. Jenis cendawan yang biasanya menjadi penyebab kontaminasi yaitu dari kelas deuteromycetes dan zygomycetes dengan ciri-ciri warna koloni putih serta ada juga yang berwarna abu-abu dengan tekstur permukaan kasar [18]. Kemunculan kontaminasi dari cendawan biasanya akan terjadi pada hari ke lima sampai tujuh hari setelah penanaman, hal ini jika sumber kontaminasi cendawannya berasal dari eksternal [18]. Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan (Tabel 3) kemunculan cendawan sebagai sumber kontaminasi terjadi antara rentan waktu 5 hari sampai 10 HSI.

Table 3. Saat Kemunculan Cendawan Pertama Kali (HSI)

PERLAKUAN	RERATA (HSI)
1RO	5
1BI	5.5
2RO	10
2BI	0
3RO	5
3BI	5

Keterangan = Perlakuan 2BI tidak muncul cendawan

3.3. Persentase Kontaminasi Bakteri

Berdasarkan hasil uji Anova pada kedua faktor maupun interaksi menghasilkan data yang tidak berbeda nyata. Hasil ini sama dengan hasil analisis dari kontaminasi cendawan. Perbedaan kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri yaitu terdapatnya titik putih dan berlendir. Pada Tabel 3 disajikan data berupa persentase kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri yaitu sebesar 6 % sampai 31 %. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh [18] dimana tingkat kontaminasinya sebesar 7 % sampai 28 %.

Table 4. Rerata Kontaminasi Bakteri

PERLAKUAN	RERATA
1RO	0
1BI	0
2RO	31.25 %
2BI	6.25%
3RO	12.5%
3BI	0

Keterangan = angka 0 menunjukkan bahwa tidak terjadi kontaminasi oleh bakteri.



3.4. Persentase Eksplan Browning

Table 5. Uji Lanjut Duncan Pengaruh Metode Sterilisasi terhadap Terjadinya Browning.

Notasi Notation	Perlakuan Treatments	Rerata Average	Nilai DMRT 5% DMRT 5% value
A2	1,5 ppm	4,33a	1,95
A3	2 ppm	8,00b	2,05
A1	1 ppm	16,00c	2,11

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

Berdasarkan hasil uji Duncan tersebut di atas, maka dapat disimpulkan bahwa metode sterilisasi yang paling efektif untuk digunakan pada kultur invitro tanaman kopi yaitu pada Metode 1.

Hasil analisa data menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa metode sterilisasi berpengaruh sangat nyata terhadap terjadinya browning pada eksplan, sedangkan beberapa jenis kopi tidak terlihat perbedaan yang nyata. Data hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa interaksi antara metode sterilisasi dan jenis kopi tidak berbeda nyata pada proses terjadinya browning. Menurut penelitian yang dilakukan oleh [17] menyatakan bahwa bahan sterilan dapat menyebabkan eksplan berwarna kecoklatan (browning) yang berujung pada kematian eksplan.

3.5. Persentase Eksplan Berkalus

Hasil analisa data menggunakan ANOVA pada umur 30 HSI, menunjukkan bahwa metode sterilisasi dan jenis kopi masing-masing berpengaruh sangat nyata terhadap pembentukan kalus pada eksplan. Data hasil pengamatan juga menunjukkan bahwa interaksi antara metode sterilisasi dan jenis kopi tidak berbeda nyata pada pembentukan kalus.

Table 6. Hasil analisa uji lanjut Duncan pengaruh metode sterilisasi dan jenis kopi terhadap persentase eksplan berkalus tertera pada table berikut.

METODE STERILISASI	JENIS KOPI		RERATA
	ROBUSTA	ARABIKA	
1	43.75 %	25%	34.37% a
2	18.75%	0	9.37% b
3	12.5%	0	6.25% b
RERATA	25% a	8.33% b	

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

Dampak browning mempengaruhi pembentukan kalus, pada metode 1 eksplan tidak ada yang browning sehingga sel mampu cepat beregenerasi membentuk kalus. Sedangkan pada metode sterilisasi 2 dan 3 beberapa sel mengalami stress dan ada yang mati akibat browning sehingga eksplan kurang maksimal membentuk kalus.

Jenis kopi juga memiliki respon yang berbeda terhadap pembentukan kalus. Data penelitian menunjukkan kopi Robusta BP 308 lebih responsif dalam melakukan pembentukan kalus.

3.6. Saat Muncul Kalus

Berdasarkan data yang tersaji pada Tabel 7, dapat disimpulkan bahwa rata-rata kemunculan kalus antara rentang waktu 11 sampai 16 hari setelah inokulasi. Meskipun terdapat beberapa kalus yang tidak muncul, yaitu pada perlakuan 2BI dan 3BI. Hal ini diakibatkan oleh pengaruh browning yang terjadi pada eksplan di perlakuan tersebut. Sehingga eksplan yang terdapat pada perlakuan tersebut belum menunjukkan tanda-tanda munculnya kalus.



Table 7. Saat Kemunculan Kalus Pertama Kali (HSI).

PERLAKUAN	RERATA (HSI)
1RO	11
1BI	14.5
2RO	15
2BI	0
3RO	16
3BI	0

Keterangan = angka 0 menunjukkan tidak ada kalus yang tumbuh pada perlakuan

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode sterilisasi 1 optimal dalam menekan kontaminasi dan juga browning. Kopi robusta BP 308 lebih responsif dalam pembentukan kalus dengan rata-rata munculnya kalus yaitu 11 hari setelah inokulasi.

5. Ucapan Terima Kasih

Terimakasih kepada Pusat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (P3M) Politeknik Negeri Jember yang telah memberikan dana penelitian Dosen Pemula sumber dana PNBPN dengan nomor Kontrak 387 /PL17.4/PG/2021.

Daftar Pustaka

- [1] Dirjen Perkebunan Kementerian Pertanian Republik Indonesia, "Statistik Perkebunan Indonesia 2018-2020 Komoditas Kopi," Jakarta, 2019.
- [2] R. L. M. Pierik, *In vitro culture of higher plants*. Springer Science & Business Media, 1997.
- [3] E. F. George, M. A. Hall, and G. J. De Klerk, *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Springer Netherlands, 2007.
- [4] I. Riyadi, "Pengaruh 2, 4-D terhadap induksi embrio somatik kopi arabika," *Bul. Plasma Nutrafah*, vol. 10, no. 2, pp. 82–89, 2017.
- [5] N. A. Campos, B. Panis, and S. C. Carpentier, "Somatic Embryogenesis in Coffee: The Evolution of Biotechnology and the Integration of Omics Technologies Offer Great Opportunities," *Front. Plant Sci.*, vol. 8, p. 1460, 2017.
- [6] D. S. M. Ibrahim, S. Sudarsono, R. Rubiyo, and S. Syafaruddin, "Pengaruh Komposisi Media terhadap

Pembentukan Kalus Embriogenesis Somatik Kopi Arabika (*Coffea arabica*)," *J. Ind. Beverage Crop.*, vol. 3, no. 1, pp. 13–22, 2012.

- [7] D. Hapsoro, D. Setiawan, R. Hamiranti, and Y. Yusnita, "Pengaruh 2-iP, BA, 2, 4-D, dan TDZ pada embriogenesis somatik in vitro kopi robusta unggul Lampung," *J. Agrotek Trop.*, vol. 7, no. 3, pp. 527–537, 2019.
- [8] R. Halupi and E. Martini, *Pedoman Budidaya dan Pemeliharaan Tanaman Kopi di Kebun Campur*. Bogor: Word Agroforestry Centre (ICRAF), 2013.
- [9] E. Harimurti, "Pertumbuhan dan Mutu Bibit Kopi Klon Bp 308 sebagai Respon Dosis Pupuk Organik dan Cekaman Kekeringan," 2015.
- [10] L. W. Gunawan, "Teknik kultur jaringan tumbuhan," *Bogor Pus. Antar Univ. Biotekol. Inst. Pertan. Bogor*, 1992.
- [11] N. Santana-Buzzy *et al.*, "Advances in coffee tissue culture and its practical applications," *Vitr. Cell. & Dev. Biol.*, vol. 43, no. 6, pp. 507–520, 2007.
- [12] A. Gatica-Arias, G. Arrieta-Espinoza, and A. Esquivel, "Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai," *Electron. J. Biotechnol. (ISSN 0717-3458) Vol 11 Num 1*, vol. 11, 2008.
- [13] T. Margono, S. D, and H. S, *Buku Panduan Teknologi Pangan*. Pusat Informasi Wanita dalam Pembangunan PDII-LIPI bekerjasama dengan Swiss Development Cooperation, 1883.
- [14] Rismana, *Sanitasi dan desinfektan, langkah awal yang efektif mencegah penyakit*. Jakarta: Infomedia, 2002.
- [15] S. F. Bloomfield, M. Arthur, E. Looney, K. Begun, and H. Patel, "Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 13, no. 5, pp. 233–237, 1991.
- [16] Z. Alfian, "Merkuri: Antara manfaat dan efek penggunaannya bagi kesehatan manusia dan lingkungan," Universitas Sumatera Utara, Medan, 2006.
- [17] A. S. Wulandari and S. S. Nasution, "Pengaruh Bahan Sterilan terhadap Keberhasilan Inisiasi Eksplan Paulownia (*Paulownia elongata* SY Hu) secara In Vitro," *J. Silvikultur Trop.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–6, 2014.
- [18] A. Shofiyani, & O. D. Hajoeningtjas, Pengaruh sterilan dan waktu perendaman pada eksplan daun kencur (*Kaemferia galanga* L) untuk meningkatkan keberhasilan kultur kalus. *Agritech: Jurnal Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Purwokerto*, 12(1). 2010.

