

**Assesment (evaluasi) terhadap proses kultur jaringan yang di lakukan dan membantu mengoptimalkan perbaikan metodologi agar lebih efektif dan minim kontaminasi pada Laboratorium**

**Dalam Rangka  
Penguatan Ketahanan Kelompok Perhutanan Sosial terhadap Perubahan Iklim melalui Pengembangan Kopi Adaptif**



**Oleh  
Edhi Sandra**



**DIVISI BIOPROSPEKSI DAN PEMANFAATAN LESTARI HIDUPAN LIAR  
DEPARTEMEN KONSERVASI SUMBERDAYA HUTAN DAN EKOWISATA  
FAKULTAS KEHUTANAN DAN LINGKUNGAN  
IPB UNIVERSITY  
2026**

Judul Artikel : Assesment (evaluasi) terhadap proses kultur jaringan yang di lakukan dan membantu mengoptimalkan perbaikan metodologi agar lebih efektif dan minim kontaminasi pada Laboratorium. Dalam rangka. Penguatan Ketahanan Kelompok Perhutanan Sosial terhadap Perubahan Iklim melalui Pengembangan Kopi Adaptif

Penulis : Edhi Sandra

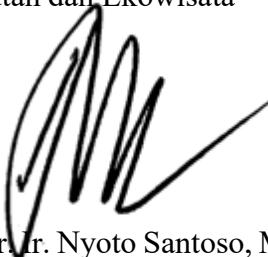
NIP : 196610191993031002

Bogor, 21 Juni 2026

Penulis,

Mengetahui,

Ketua Departemen Konservasi Sumberdaya  
Hutan dan Ekowisata



(Dr. Ir. Nyoto Santoso, MS)



( Ir. Edhi Sandra MSi )

**Assesment (evaluasi) terhadap proses kultur jaringan yang di lakukan dan membantu mengoptimalkan perbaikan metodologi agar lebih efektif dan minim kontaminasi pada Laboratorium.**

## **I. Pendahuluan**

Dalam rangka Assesment (evaluasi) terhadap proses kultur jaringan yang di lakukan dan membantu mengoptimalkan perbaikan metodologi agar lebih efektif dan minim kontaminasi pada laboratorium, dalam rangka. penguatan ketahanan kelompok perhutanan sosial terhadap perubahan iklim melalui pengembangan kopi adaptif, maka perlu dikumpulkan semua informasi terkait yang sudah dilaksanakan dalam mengelola atau melakukan setiap operasional dalam kultur jaringan. Pengumpulan data dan informasi untuk dapat mengavaluasi tidak cukup hanya dari laporan karena persepsi dalam melaksanakan kultur jaringan akan membuat laporan menjadi kurang tepat. Oleh sebab itu perlu secara langsung untuk melihat situasi dan kondisi serta melihat secara langsung pengelolaan dan melaksanakan setiap kegiatan kultur jaringan. Oleh sebab itulah dilakukan kunjungan langsung ke labortatorium dan melihat langsung pengelolaan laboratorium kultur jaringan pada tanggal 7 sampai dengan tanggal 11 Mei 2026 diLaboratorium Kultur Jaringan Kabupaten Toraja Utara, Sulawesi Selatan

## **Metode Asesment**

Adapun untuk dapat mengumpulkan semua data dan informasi maka perlu di landaskan pada kaidah ilmiah yang mengacu pada seluruh faktor yang mempenmgaruhi keberhasilan kultur jaringan khususnya dalam hal ini adalah kontaminasi. Kontaminasi memiliki sangat banyak faktor yang menyebabkan di setiap tahapannya. Padahal tahapan dan waktu yang diperlukan sangat pnajang. Oleh sebab itulah seringkali sudah berhasil pada tahap-tahap awal kultur jaringan tapi kemudian tidak hati-hati dan gagal atau kontaminasi pada tahap berikutnya maka seluruh tahapan kultur jaringan akan menjadi sia-sia.

Metode Asesment yang dilakukan Adalah:

1. Mengumpulkan data dan informasi. Pengambilan data dan informasi melalui melihat secara langsung pnegelolaan laboratorium kultur jaringan
2. Diskusi secara intensif terkait permasalahan dan cara melaksanakan setiap tahapan kultur jaringan yang dilakukan.
3. Mengevaluasi bahan dan alat yang digunakan serta cara menggunakannya
4. Melihat secara langsung cara melakukan kegiatan kultur jaringan

5. Mencontohkan cara melakukan tahapan kultur jaringan dan membandingkan dengan yang dilakukan sendiri
6. Menyampaikan pengetahuan, wawasan, dan ruang lingkup terkait dengan kontaminasi dan faktor serta asal usul kontaminasi melalui diskusi dengan semua komponen Yayasan
7. Menyampaikan trik dan tip dalam menanggulangi kontaminasi yang seringkali terjadi dalam pengelolaan laboratorium kultur jaringan.
8. Menyampaikan strategi antisipasi kegagalan kontaminasi dalam pencapaian target proyek berjalan.

Dan untuk meningkatkan dan optimalisasi asesment maka perlu dilakukan hal seperti dibawah ini:

1. Survei, observasi dan wawancara
2. Melihat Pelaksanaan Kegiatan Kuljar
3. Perbaikan, evaluasi dan penyempurnaan
4. Pendampingan dan ujian/tes
5. PPT. Materi, Aturan dan Tata Tertib, Ragam Kontaminasi, Video Pembahasan Materi Kontaminasi, Video Inisiasi Kopi, Video Penguatan Tutup botol kultur jaringan
6. Tidak sekedar himbauan, Tidak sekedar Tahu, tapi membentuk SOP, Tata Tertib, Keterampilan dan kompetensi

Lab skala rumahan, SOP sama, situasi kondisi sama, tapi hasil beda.

Persepsi dan cara pengerjaan berbeda

7. Sertifikasi, Standar, Asesment, Penilaian, Prediksi keberhasilan
8. Strategi mengatasi kontaminasi

Metode sama. Pelaksanaan sama hasil beda, kenapa?

Kecepatan, dan keterampilan untuk mengerjakan yang terbaik

Kontaminasi mikroba endofit (kontaminasi laten, tidak terlihat silent)

9. Strategi pencapaian tujuan program/projek (diluar wawasan, tidak terbayangkan sebelumnya)
10. Prioritas penanganan Kontaminasi
  - Mengatasi kontaminasi sistemik
  - Kecepatan kerja, menjaga kesterilan
  - Menutup yang sangat kuat (Relatif, subjektif)

## **II. Hasil dan Pembahasan**

### **II. 1. Materi Kontaminasi Dalam Kultur Jaringan**

Penyampaian terkait pengetahuan, wawasan, ruang lingkup kontaminasi dalam pengelolaan laboratorium kultur jaringan. Oleh sebab itulah tahap awal diberikan materi terkait dengan kontaminasi secara global dan holistik, ragam kontaminasi dan penyebab atau asal usul kontaminasi tersebut. Adapun materi terkait kontaminasi seperti di bawah ini:

#### **Kendala Teknis: Kontaminasi Eksplan dan Media**

Permasalahan kontaminasi yang terjadi merupakan awal dari perjalanan panjang kultur jaringan. Strategi mengatasi permasalahan saat ini adalah fokus mengatasi kontaminasi yang terjadi saat ini. Mengetahui dan mengatasi kontaminasi yang akan datang. Mengetahui dampak kontaminasi terkait dengan kesuksesan kegiatan atau program dan antisipasinya. Strategi agar kegiatan dapat berjalan dengan sukses, dengan melakukan berbagai alternatif solusi

#### **Tahapan teknis kultur jaringan**

Tahapan teknis kultur jaringan bila diuraikan dari awal maka di mulai dari penyediaan ruang laboratorium kultur jaringan, penyediaan alat dan bahan kultur jaringan, penyediaan bahan tanaman kultur jaringan (dalam hal ini kopi yang mau di kulturkan). Ho pengelolaan laboratorium kultur jaringan. Mensterilkan semua ruang dalam laboratorium kultur jaringan. Mensterilkan semua alat dan bahan, dan semua bahan steril yang diperlukan dalam penanaman dalam kultur jaringan. Persiapan bahan indukan eksplan. Persiapan dan penanganan bahan eksplan, sterilisasi dalam inisiasi (inisiasi), subkultur (perlakuan, penyelamatan, penjarangan, perbanyakkan, dll), elongasi, pembentukan plantlet. Aklimatisasi (Normalisasi hormon, adaptif media tanaman dalam kultur, hardening dalam botol kultur, penyungkupan berlapis, (stek mikro, percepatan perbanyakkan bibit hasil kultur jaringan), pembukaan sungkup bertahap, repotting dengan polibag di rumah kaca, pembibitan pada nursery terbuka (siap tanam)

#### **Permasalahan Teknis Kultur Jaringan**

Permasalahan teknis dalam kultur jaringan ada 4 yaitu kontaminasi, browning (pencoklatan), viabilitas, dan karantina. Permasalahan yang paling awal dan paling banyak menyebabkan kegagalan adalah kontaminasi. Permasalahan kontaminasi disebabkan ketidaksanggupan kita di dalam menyediakan sesuatu (bahan tanaman, bahan penunjang, alat-alat tanam dll) yang steril dalam setiap tahap dan situasi dan kondisinya. Hal ini bisa dipahami

karena kultur jaringan adalah suatu teknologi yang menuntut kondisi steril dalam setiap tahap kegiatannya dari awal sampai keluar laboratorium. Padahal di sisi lain tanaman (apalagi tanaman dari hutan, tumbuhan liar) banyak mengandung mikroba endofit.

### **Analisa kontaminasi**

Kita harus tahu dan mampu menganalisa kontaminasi agar dapat diketahui asal susul penyebab kontaminasinya sehingga tidak salah penanganan evaluasi yang akan dilakukan. Secara garis besar kontaminasi dapat dikelompokkan menjadi beberapa kelompok kontaminasi

1. **Kontaminasi yang terjadi langsung setelah inisiasi dan yang terkontaminasi adalah eksplannya.** Pada kontaminasi seperti ini berarti kontaminasi yang berasal dari teknik menterilisasi eksplannya masih kurang optimal, sehingga masih banyak mikroba yang menempel pada permukaan eksplan dan tidak mati yang begitu terkena media yang sangat subur, akan bangun berkembangbiak dan menyebabkan terkontaminasi yang menempel pada eksplannya. Dalam kelompok ini juga termasuk penggunaan alat seperti pisau bedah atau skalpel atau pinset yang masih ada kontaminasi pada alat tersebut yang menyebabkan terkontaminasinya eksplan.
2. **Kontaminasi yang terjadi langsung setelah inisiasi dan kontaminasi terjadi bukan pada eksplan tapi pada media kultur.** Pada kontaminasi seperti ini disebabkan cara tanam yang masih kurang optimal sehingga masuknya mikroba ke dalam botol kultur dan menempel pada media kultur. Hal ini umumnya disebabkan karena kondisi laboratorium yang tidak steril, sehingga banyak mikroba yang beterbangan dan masuk ke dalam botol kultur. Demikian pula cara kerjanya yang kurang hati-hati sehingga mikroba yang beterbangan masuk ke dalam botol, seharusnya dalam penanaman (inisiasi atau subkultur) harus dilakukan dengan penuh kehati-hatian dengan selalu mengingat bahwa di lab kondisi banyak mikroba beterbangan. Atau juga bisa disebabkan karena kurang kompeten dan kurang terampil. Cara mengerjakan sudah baik tapi karena kurang kompeten dan kurang terampil maka proses penanaman jadi lama sehingga terbukanya botol kultur dan petridish tempat memotong dan meletakkan eksplan terkontaminasi oleh mikroba dari udara. Sebaiknya membukanya botol kultur dan petridish tidak lebih dari 3 detik.
3. **Kontaminasi yang terjadi setelah beberapa hari steril (lebih dari 7 hari), dan menempel pada eksplan.** Pada kontaminasi seperti ini berarti bahwa proses mensterilkan permukaan eksplan sudah bagus terbukti dari tidak terkontaminasi saat

ditanam, steril. Tapi karena masih adanya mikroba di dalam eksplan dan keluar dari eksplan setelah beberapa waktu (perlu waktu untuk mikroba melompati dari satu sel ke sel berikutnya sampai ke bagian luka) maka mengkontaminasi eksplan dan media di sekitarnya. Jadi yang mengkontaminasi adalah mikroba yang keluar dari dalam eksplannya itu sendiri (Kontaminasi mikroba endofit)

4. **Kontaminasi yang terjadi setelah beberapa hari steril (lebih dari 7 hari), dan kontaminasi terjadi pada media kultur.** Pada kontaminasi seperti ini disebabkan tutup botol kultur yang kurang kuat sehingga udara masuk ke dalam botol kultur membawa mikroba dan menyebabkan kontaminasi pada media kultur.

Kontaminasi pada botol

Botol mikroba berkerak/ botol bekas baru

Kasus kontaminasi meningkat sampai 40% di Esha Flora.

Kontaminasi pada media

Bahan organik media

Media dengan gelrite + BSP / PPM

Air media

Lingkungan

Autoclave

Kebersihan autoclave

Air autoclave

Proses sterilisasi autoclave

Kontaminasi pada bahan eksplan

Kontaminasi Saat Inisisasi

Deterjen /Tween 80, usap/sikat dibawah air keran mengalir sedang

Kontaminasi Saat Subkultur

Mikroba endofit

Kasus kontaminasi sporadis setiap saat dan selalu kontaminasi (terkesan tidak ada masalah, tapi saat stock opname, kontaminasi perbulan sampai 300-500 botol, kerugian @ Rp. 10.000/botol kultur)

Strategi memutus kontaminasi mikroba endofit

Saat kerja subkultur

Saat inkubasi tutup kurang kuat

Tahapan penutupan botol agar tidak kontaminan, tapi efisien dan ekonomis

Kasus awal buka lab kuljar di Esha Flora 1 tahun lebih kontaminasi terus  
Kontaminasi Saat aklimatisasi

Prioritas penanganan kontaminasi

Penanganan eksplan saat inisiasi

Sterilisasi permukaan

Sterilisasi endofit

Penanganan Mikroba endofit

Karantina bahan indukan eksplan

Perendaman antibiotik

Permasalahan kontaminasi yang berdampak pada pencapaian tujuan

Permasalahan kontaminasi yang berdampak terhadap manfaat.

Menyederhanakan masalah kontaminasi terhadap tujuan dan manfaat program

Bila bisa dilakukan diluar laboratorium kultur jaringan maka sebaiknya dilakukan diluar laboratorium kultur jaringan. Kegiatan yang dilakukan dalam laboratotium kultur jaringan focus pada kegiatan atau tahapan yang tidak bisa dilakukan diluar

### **Pengembangan Kopi Adaptif**

Eksplorasi Keanekaragaman Genetik Kopi

Masuk kategori tanaman perkebunan dan liar karena sudah lamanya varietas kopi yang ada, karakteristik: kontaminasi mikroba endofit sangat tinggi (populasi atau jumlah). Keanekaragaman genetik yang relatif tinggi.

Genetik Kopi yang adaptif terhadap Perubahan Iklim

Meningkatkan variasi genetik kopi

Membangkitkan karakter genetik yang adaptif

Genetik adaptif yang selalu adaptif pada perubahan iklim terbaru

Strategi menyiapkan kopi adaptif setiap saat kondisi iklim yang terjadi

Satuan lahan tanaman kopi yang terdiri dari berbagai varietas kopi.

Menyediakan fasilitas benih kopi berkecambah secara alamiah

dibawah tegakan.

Sampling lahan di beberapa tempat yang mewakili kondisi iklim mikro yang ada.

Adaptif dalam dimensi waktu yang panjang mengikuti perubahan iklim

Permasalahan teknis dan nonteknis terkait pengembangan Kopi Adaptif

Efisiensi dan efektivitas kultur jaringan Kopi Adaptif

Kombinasi kuljar dan konvensional



1. Kuljar: inisiasi, subkultur, aklimatisasi

Penyelamatan kontaminasi

Pemutusan kontaminasi mikroba endofit

Permasalahan laten yang berdampak sangat besar terhadap keberhasilan, berdampak pada persentase kontaminasi yang cukup besar dalam waktu panjang dan bahkan kegagalan total

Kasus Kontaminasi mikroba endofit pada laboratorium kultur jaringan di Bandung, pada kultur jaringan pisang, terkontaminasi mikroba fusarium dan pada akhirnya kontaminasi semua dalam satu laboratorium kultur jaringan

Diluar kultur: stek mikro

Stek bagian tanaman yang belum berkayu dan berukuran relative sama dengan tanaman dalam kultur jaringan. Kondisi harus steril dan tertutup/sungkup. Media disterilkan gabungan cocopeat dan sekam bakar

2. Diluar: variasi genetik adaptif perubahan iklim

Karantina dan eliminasi mikroba endofit

Perendaman antibiotik

Kuljar: kloning varietas unggul adaptif

## **II.2. Aturan Dan Tata Tertib**

Hal yang tidak kalah pentingnya cara mengelola laboratorium kultur jaringan dengan menegakkan aturan dan tata tertib yang harus dilaksanakan dengan disiplin yang kuat termasuk untuk siapapun tidak terkecuali dalam beraktivitas di dalam laboratorium kultur jaringan. Hal ini sangat berkaitan langsung dengan Tingkat kontaminasi. Bila aturan dan tata tertib ini tidak dilakukan dengan disiplin yang konsisten maka kontaminasi akan dijamin meningkat.

### **Tata Tertib**

1. Semua SOP yang dilakukan harus didokumentasikan/ tertulis sehingga Pengelolaan laboratorium kultur jaringan tidak bergantung pada perorangan.
2. Semua yang dilakukan harus dituliskan dan semua yang ditulis harus dilakukan
3. Semua kegiatan yang dilakukan di dalam laboratorium harus mengikuti SOP yang telah dibuat dan disepakati.

4. Harus ada laporan harian dari setiap pekerja, laporan kinerja, kegiatan apa saja yang dilakukan berapa banyak dan sop nya juga harus dilakukan

Menjaga standar kesterilan laboratorium kultur jaringan harus disiplin dilakukan sesuai dengan interfal waktu yang sudah ditetapkan

5. Kondisi laboratorium harus selalu dalam kondisi steril dan kedap

6. Setiap yang dilakukan harus dituliskan, termasuk yang tidak bisa dilakukan tapi seharusnya dilakukan juga dituliskan. Sangat penting untuk evaluasi

7. Setiap pekerja di dalam laboratorium wajib menggunakan seragam standar (alas kaki steril, jas lab steril, tutup mulut dan hidung serta tutup kepala)

8. Harus ada Quality kontrol dan quality insurance

9. Harus ada kontrol kinerja dan ketercapaian target

10. Harus ada kontrol kontaminasi dan evaluasi tuntas secepatnya, satu-persatu tuntas

11. Setiap bahan dan alat yang digunakan harus tercatat siapa yang melakukan, untuk apa dan tanggal berapa. Lengkap agar diketahui kadaluarsa atau fungsionalnya.

### **Aturan**

1. Setiap laboran harus menggunakan APD (Alat Pelindung Diri) standar, melaksanakan aturan dan tata tertib, melaksanakan dan mengikuti SOP yang sudah disepakati dan mengisi laporan harian.

2. Setiap laboran harus memprioritaskan agar setiap pekerjaan tuntas atau bisa di potong kegiatannya pada tahap yang aman (tidak menyebabkan matinya tanaman atau kontaminasi.

3. Setiap laboran wajib ikut menjaga kesterilan laboratorium, dan ikut menjaga agar laboratorium dapat berfungsi optimal, ikut mengingatkan dan melaporkan bila ada laboran lain yang melakukan kesalahan atau kelalaian.

4. Setiap laboran harus memiliki rasa memiliki, membersihkan yang kotor, mentserilkan yang kotor, mengembalikan barang pada tempatnya, membetulkan yang salah, menyempurnakan yang kurang sempurna, melengkapi yang kurang, bertanggungjawab terhadap tugas dan pencapaian target

### **II.3.Ragam Kontaminasi**

Untuk memudahkan mengevaluasi maka perlu diketahui ragam kontaminasi dan asal usulnya, seperti tabel 1 di bawah ini:

| No | Asal usul                                                                                       | Masalah kontaminasi                                                                                                                                                                                                                                                                                           | solusi                                                                                                                                                                                                                                        | Keterangan                                                                                                                                     |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. | Laboratorium:<br>Pintu lab<br><br>Udara lab<br>Lantai lab<br>Rak kultur<br>Dinding dan atap lab | 1.Masuknya debu/mikroba dari luar lab.melalui udara.<br>2.Masuknya debu/mikroba melalui baju/dan orangnya<br>3.Masuknya debu/ mikroba melalui alas kaki<br>4.Masuknya debu/mikroba melalui barang yang dibawa<br><br>Kontaminasi udara, mengendap dan beterbangan, akumulasi, menempel ke semua barang di lab | Box cofit<br>Jas lab, tutup mulut & hidung<br>Keseset desinfektan dan ganti alas steril<br>Simpan, jam, cincin, dll<br><br>AC plasma cluster, Lampu UV, Air purifier,<br>Di pel (lap dengan diberi larutan desinfektan (wipol atau detol dll) | 3 level box: 1. Dua pintu, 2 Dua pintu + blower. 3. dua pintu + blower +alkohol                                                                |
| 2  | Alat dan bahan<br><br>Autoclave:<br><br>Botol<br><br>Laminar Air Flow                           | 1. Kontaminan yang mengerak pada pinggir dasar dan grat mulut botol, kontaminan botol bekas yang baru dipakai untuk kultur<br><br>1. Air autoclave, 2. Saat membuka autoclave<br><br>Botol baru<br>Botol kontaminan berkerak (didiatkan dalam waktu lama)                                                     | Cuci , air steril , membuka ditempat steril<br><br>Di rendam, bayclean 24 jam, autoclave 3 kali, setiap hari                                                                                                                                  | Tekanan rendah udara masuk dalam autoclave dan botol yang telah disteril<br>Botol steril, masuk debu, kedap udara, panas, mikroba masih dorman |
| 3  | Bahan Tanaman<br>Tunas<br>Biji<br>jaringan                                                      | Kontaminasi permukaan<br>Komntaminasi endofit                                                                                                                                                                                                                                                                 | Sterilisasi di luar dan di dalam Laminar Air Flow<br><br>Karantina bahan indukan eksplan dan perendaman antibiotik                                                                                                                            |                                                                                                                                                |
| 4  | Orang/Laboran                                                                                   | 1. Baju, Rambut, mulut/saat sakit flu                                                                                                                                                                                                                                                                         | Sarung tangan karet, tutup mulut dan hidung, jas lab, tutup kepala                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                |
| 5  | Cara Kerja                                                                                      | 1. Kompetensi dan keterampilan                                                                                                                                                                                                                                                                                | Kecepatan kerja, cara kerja<br>Mengganti atau mensterilkan Kembali petridish setelah menanam satu botol kultur<br>mentsterilkan alat tanam ke dalam alkohol 70 % dan di bakar, dan direndam air steril setiap kali menggunakannya             | Botol kultur atau petridish Terbuka dalam waktu yang sangat singkat                                                                            |

#### II.4. Cek Lis Kegiatan Antisipasi Kontaminasi

Banyaknya ragam asal usul kontaminasi dan penyebab kontaminasi maka perlu dibuat cek lis daftar yang harus dilakukan yang akan berdampak secara langsung dengan tingkat kontaminasi. Cek lis kegiatan yang perlu dilakukan seperti di bawah ini:

1. ☐ Perendaman botol kultur kontaminan berkerak (terakumulasi dan mengering di dalam botol kultur) dengan bayclin selama 24 jam.
2. ☐ Botol kultur yang akan digunakan sebaiknya Adalah botol kultur Yang mulutnya kecil seperti botol asi atau botol You C 1000
3. ☐ Autoclave 3 kali (sekali setiap hari sampai 3 hari)
4. ☐ Memasukkan botol yang telah diautoclave ke dalam kantong plastik & tutup rapat.
5. ☐ Setelah seminggu cek masih ada kontaminan di botol atau tidak. Pakai yang tidak kontaminan.
6. ☐ Botol kultur yang steril digunakan untuk wadah media kultur yang akan dibuat,
7. ☐ Botol kultur yang akan dipakai bagian atas ditutupi dengan plastik bening sebelum dituang media yang telah dibuat, agar mikroba dari udara tidak masuk ke dalam botol kultur steril.
8. ☐ Wadah alat-alat yang digunakan harus steril
9. ☐ Air untuk membuat media harus air steril atau menggunakan Le minerale atau Aqua gallon tapi jangan yang isi ulang.
10. ☐ Media kultur sebaiknya menggunakan media *Murashige and Skoog* instan
11. ☐ Bila menggunakan media *Murashige and Skoog* racikan harus pakai air steril, alat-alat yang digunakan steril, ditutup rapat. Saat menggunakan alat-alat harus khusus atau dibilas dulu dengan air steril.
12. ☐ Penggunaan media stok racikan jangan sampai terkontaminasi oleh alat-alat yang digunakan atau terkontaminasi dari udara. Bila ada tanda tanda kontaminasi sebaiknya diganti yang baru. Media stok jangan sampai lebih dari 3 bulan.
13. ☐ Setelah diramu semua dan direbus, tambah gula dan pematat. Pematat juga harus yang baik/bersih berpeluang terkontaminasi, cek ph pada 5,7 - 6
14. ☐ Setelah direbus/dimasak/mendidih, dimasukkan dalm botol kultur menggunakan wadah yang ada kerucut diujungnya agar tumpahnya larutan media tidak mengenai mulut botol kultur, Atau dengan menggunakan pipet suntik sehingga tidak mengotori mulut botol.
15. ☐ Botol kultur ditutup dengan plastik dengan satu karet 3 lilitan.
16. ☐ Masukkan ke dalam autoclave yang sudah disiapkan.
17. ☐ Autoclave wajib dicuci bersih bagian dalamnya dengan detergen dan bayclin, dan menggunakan air steril untuk air di dalam autoclave.

18. ☐ Masukkan dandang autoclave, tutup autoclave dengan penguatan skrup berbarengan yang berhadapan agar tutup autoclave tidak miring yang dapat menyebabkan bocornya tekanan udara dari dalam autoclave.
19. ☐ Nyalakan autoclave dengan valve masih terbuka agar air menguap terlebih dahulu dan memenuhi bagian dalam autoclave dan keluar melalui valve baru valve di tutup sehingga di dalam autoclave sudah terpenuhi dengan uap air panas, jarum tekanan akan naik dan diseting pada tekanan 17,5 psi, suhu 121 0C dijaga agar tetap stabil pada posisi tersebut. Dilarang jangan sampai “ngejos” (*Safety valve* terbuka karena tekanan berlebih).
20. ☐ Jaga pada posisi tersebut selama 30 menit, baru api dimatikan maka jarum akan turun secara perlahan sampai nol. Setelah jarum menunjukkan nol valve dibuka untuk menyamakan tekanan antara di dalam dan diluar autoclave.
21. ☐ Membuka autoclave sebaiknya di ruang steril atau buat semacam box telpon yang tertutup rapat, karena saat membuka autoclave berpeluang masih ada perbedaan di dalam autoclave dengan udara di dalam lab, Bila di dalam lab banyak mikroba berterbangan maka berpeluang masuk ke dalam autoclave dan ke dalam botol yang masih panas berarti tekanan udara masih rendah.
22. ☐ Tutup botol ditambah karet, dikuatkan dengan 2 karet dengan 3 lilitan.
23. ☐ Kemudian botol kultur yang telah berisi media dan telah diautoclave dimasukkan dalam kantong plastik media kultur steril sehingga aman dari udara laboratorium yang penuh dengan mikroba.
24. ☐ Tunggu satu minggu dan dicek ada kontaminan di media atau tidak
25. ☐ Melihat kontaminasi media dengan melihat dari bagian bawah botol kultur. Setiap hari selama 7 hari diamati untuk melihat awal mula tumbuhnya kontaminan berasal dari bagian eksplan atau media kultur.
26. ☐ Bila ada yang kontaminan langsung di eliminir dan diautoclave agar tidak terakumulasi didalam botol kultur dan tidak menyebabkan kontaminasi laboratorium ke depannya dan juga sebagai standar pengelolaan limbah yang baik
27. ☐ Media kultur yang tidak kontaminan saja yang digunakan, setelah dilihat tidak kontaminan, maka bila belum dipakai untuk ditanam maka harus dimasukkan dalam plastik media kembali agar tidak terkontaminasi lagi oleh kondisi lab yang tidak steril.

28. ☐ Laminar yang akan digunakan untuk menanam harus disterilkan terlebih dahulu, dinyalakan UV nya 1 jam sebelumnya., Blower dinyalakan 10 menit sebelumnya. Untuk membuang debu dan mikroba yang masih tertinggal di ruang kerja laminar. Saat Laminar mau dipakai maka lampu UV di matikan . Blower tetap menyala.
29. ☐ Semua alat dan bahan termasuk tangan kita yang akan masuk ke dalam ruang kerja laminar harus disemprot dengan alkohol. Semua di tata posisinya di dalam ruang kerja sesuai dengan SOP yang sudah ditetapkan.
30. ☐ Untuk mensterilkan botol kultur yang akan di buka maka sebaiknya direndam dalam alkohol terlebih dahulu, dibuka tutup botol kulturnya disemprot lagi dengan alkohol baru dimasukkan dalam laminar.
31. ☐ Untuk Eksplan/plantlet yang besar petridish diganti dengan botol bertutup botol yang sudah disterilkan. Gunakan botol selai steril bertutup steril, perlu 2-3 botol selai steril bertutup, kemudian ambil plantlet dari medianya masukkan ke dalam botol steril di tutup, gunakan gunting dan pinset, dipisah menjadi 3 bagian agar tidak terlalu besar dalam satu botol selai steril.
32. ☐ Jangan lupa gunting dan alat tanam sudah disterilkan autoclave 1 jam, di bakar dengan api bunsen setiap akan digunakan.
33. ☐ Di dalam botol steril tersebut plantlet dengan menggunakan gunting digunting seukuran 0,5 cm jadi lebih cepat, Proses harus cepat dan tutup Kembali. Kemudian dengan menggunakan pinset dimasukkan kedalam botol kultur, tidak perlu ditancapkan yang penting eksplan bisa kontak dengan media tanam. Usahakan proses berlangsung tidak lebih dari 3 detik.
34. ☐ Setelah semua tertanam langsung masih di dalam laminar air Flow tutup botol dikuatkan tutup plastik dan karetanya. Dan masukkan dalam kantung plastik media dan disemprot dengan alkohol, kemudian dikutakan lebih kuat lagi dengan 3 lapis plastik 2 lapis alumunium dan karet 10 karet, masing-masing dililit sekitar 4-5 lilitan, kemudian di wrap, 30 lilitan, kemudian diselotif 100 lilitan, dan di wrap lagi 30 lilitan. Insyaa Allah bisa menahan masuknya udara dari tutup botol kultur
35. ☐ Amati kultur hasil inisiasi setiap hari untuk dapat menemukan awal mula tumbuhnya kontaminasi. Dengan menggunakan metode analisa kontaminasi maka dapat diduga asal mula penyebab kontaminasi dan bisa dilakukan rencana mengatasinya.

**Catatan:**

1. Setelah terjadi kontaminasi maka **cek list** ini digabung dengan **analisis kontaminasi** akan lebih mengerucutkan penyebab kontaminasi dari analisis kontaminasi dan bisa lebih memudahkan penyebabnya dengan melihat cek list kegiatan yang tidak dilakukan.
2. Lalu dilakukan perbaikan dengan mengacu pada analisa tersebut, lalu dilakukan penyelamatan, kembali diamati satu minggu dan amati setiap hari, dan kembali dievaluasi berdasar analisa kontaminasi, dan di cek and recek berdasarkan cek list kegiatan yang tidak dilakukan, dan dicari lagi mana dari cek list yang tidak dilakukan dikaitkan dengan asal usul penyebab yang terjadi pada analisa kontaminasi, terus sampai didapatkan kultur steril
3. Bila semua kegiatan telah di cek dan sudah dilakukan tapi masih ada kontaminan berarti masih ada kegiatan yang belum masuk dalam daftar cek list yang masih berpengaruh penting terhadap keberhasilan inisiasi (tidak kontaminasi). Maka perlu dicari kegiatan apa yang belum termasuk dalam daftar cek list yang berpengaruh dalam keberhasilan inisiasi. Bila sudah ditemukan maka kegiatan tersebut perlu ditambahkan dalam daftar cek list, sehingga lambat laun akan lebih lengkap dan keberhasilan inisiasi menjadi lebih tinggi dan sempurna

**II.5. SOP Kultur Jaringan**

Perlu dibuat SOP tahapan kultur jaringan yang mengacu pada antisipasi kontaminasi dari SOP yang akan dibuat inilah akan dapat dievaluasi apakah caranya dalam mengantisipasi kontaminasi sudah memadai atau belum dalam mengantisipasi kontaminasi. Standar Operasional prosedur yang perlu di buat adalah:

1. Standar Operasional Prosedur : Persiapan Laboratorium Kultur Jaringan
  - 1.1. SOP Sterilisasi Ruang Tanam Laboratorium Kultur Jaringan
  - 1.2. SOP Sterilisasi Laminar Air Flow Cabinet
2. Standar Operasional Prosedur : Persiapan Alat bahan Kultur Jaringan
  - 2.1. SOP Sterilisasi dan setting peralatan tanam dan botol kultur steril.
3. Standar Operasional Prosedur : Persiapan Bahan Eksplan Tanaman Kopi
4. Standar Operasional Prosedur : Inisiasi Eksplan Kopi
  - 4.1. SOP Sterilisasi Bahan Eksplan Tunas
  - 4.2. SOP Sterilisasi Bahan Eksplan Biji
5. Standar Operasional Prosedur : Pengelolaan Kultur Kopi di Ruang Inkubasi
  - 5.1. SOP Setting Kondisi Ruang Inkubasi

- 5.1.SOP Pengamatan Hasil Inisiasi dan Analisa Kontaminasi selama 7 hari
- 5.2.SOP Penyelamatan Kultur Terkontaminasi berdasar Asal usul Kontaminasi
  - 5.2.1.SOP Sterilisasi kultur terkontaminasi di media kultur
  - 5.2.2.SOP Sterilisasi kultur terkontaminasi pada eksplan (mikroba endofit)
- 6. Standar Operasional Prosedur :Subkultur Multiplikasi Kultur Kopi
  - 6.1.SOP Multiplikasi Tunas
  - 6.2.SOP Multiplikasi Kalus dan Embrio Somatik
- 7. Standar Operasional Prosedur :Subkultur Pembentukan Plantlet
- 8. Standar Operasional Prosedur :Aklimatisasi
  - 8.1.SOP Normalisasi Hormon
  - 8.2.SOP Hardening
  - 8.3.SOP Penyungkupan bertingkat dan pembukaan bertahap
  - 8.4.SOP Repotting dari compot ke pot individual

## **II.6. Aspek Spiritual terkait Kontaminasi dan pertumbuhan kultur**

Ada hal-hal yang turut terkait dengan keberhasilan dan pertumbuhan kultur jaringan yang baik yaitu aspek spiritual, yang secara ilmiah masih belum sepenuhnya dapat dilimiahkan secara lengkap tapi semakin berkembangnya pengetahuan maka akan semakin relevan dengan hal ini. Aspek Spiritual dalam kultur jaringan:

1. Keberkahan, memperlancar kegiatan /projek. Keberkahan menuntun ke hidayah dan taufik. Ada saja hal-hal yang tidak diinginkan. Masalah yang selalu muncul.
2. Kesombongan akan menjatuhkan dan membuat gagal. Semua yang diusahakan akan gagal. Bila kita merasa mampu mengendalikan projek (maka harus hati-hati). Seringkali kita merasa mudah mengkultur kan tanaman tersebut, tapi ternyata hasil gagal total.
3. Saat wanita datang bulan, kontaminan akan meningkat. Hormonal, kondisi emosial tidak stabil, ketenangan dan ketelatenan dalam mengerjakan berbeda
4. Murotal Quran mempercepat pertumbuhan kultur, dan mengurangi kontaminan. Memasang murotal ayat suci di dalam ruang inkubasi
5. Sholat tepat waktu dan sholat sunat duha, mendatangkan keberkahan dan kesuksesan. Berwudhu sebelum masuk laboratorium kultur jaringan
6. Niat karena Allah dan bismillah meningkatkan keberhasilan dan persentase kesterilan



7. Niat kegiatan untuk membantu petani dan masyarakat. Menimbulkan keberkahan, ketenangan dan kelancaran serta kesuksesan
8. Meningkatkan kemanfaatan bagi masyarakat luas dan berbagai pihak

## **II.7. Hasil Evaluasi Pengelolaan Laboratorium kultur jaringan Dan Penanganan Kultur Jaringan Kopi Adaptif**

1. Tidak adanya perlakuan karantina bahan indukan eksplan Tanaman dan perlakuan perendaman antibiotik, bahan indukan tidak diisolasi, tapi masih terbuka di tempat pembibitan tercampur dengan yang lain
2. Penanganan bibit kopi yang terserang hama penyakit tidak ditangani dengan baik
3. Penanganan eksplan kopi saat inisiasi masih kurang optimal
4. Penggunaan air untuk media harus ditingkatkan kesterilannya, tidak harus air aquades tapi yang penting adalah air steril, yaitu air yang telah diautoclave dengan baik.
5. Penanganan autoclave masih harus ditingkatkan terkait waktu sterilisasi satu jam untuk alat dan 30 menit untuk media kultur
6. Setting ruang tanam sebaiknya di sekat lagi pada bagian yang terdalam (sistem rumah keong) dan dilakukan dengan standar kesterilan yang tinggi (AC plasma kluster, lampu UV, tekanan positif), sterilisasi dengan desinvektan, gunakan penyedot debu (jangan di sapu, sama saja dengan menyebar debu)
7. Menggunakan agar gelrite yang relative sudah mengandung antiseptic dan gunakan BSP atau PPM di media
8. Sterilisasi ruangan laboratorium kultur jaringan masih kurang optimal
9. Perlu dibuat aturan dan tata tertib laboratorium yang disiplin yang harus dilaksanakan secara konsisten oleh semua pihak
10. Tutup botol kultur yang kurang kuat sehingga masih ada peluang bocor
11. Ruangan diantara pintu masuk pertama laboratorium dan pintu kedua laboratorium kultur jaringan, standar operasional dalam menjaga kesterilannya masih sangat kurang.
12. Penanganan kontaminasi mikroba endofit masih kurang optimal. Penggunaan antibiotik saat karantina, perendaman antibiotik dan di media kultur
13. Strategi dalam mengatasi kontaminasi dan terbatasnya waktu yang tersedia: lakukan inisiasi dengan berbagai bahan eksplan yaitu biji, kecambah yang dikarantina, bibit tanaman yang ada. Lakukan inisiasi yang sebanyak-banyaknya, usahakan mencapai total 1000 eksplan. Misal Biji: sebanyak 1000 biji yang diinisiasi, kecambah sebanyak

1000 tunas kecambah, tunas apikal dari pembibitan yang ada yang telah diberi perlakuan karantina. Media kultur yang digunakan telah menggunakan BSP

## **Simpulan Dan Saran**

### **Simpulan**

Dari hasil asesmen terdapat banyak hal yang perlu diperbaiki terkait, hal-hal kecil yang secara teknis sederhana tapi bila cara mengerjakannya salah atau kurang benar maka hasilnya akan kontaminasi. SOP tahapan kultur jaringan perlu didetailkan terkait dengan antisipasi kontaminasi. Kualitas kesterilan, situasi dan kondisi laboratorium serta aturan tata tertib perlu ditingkatkan. Perlu adanya penambahan bahan-bahan yang perlu ditambahkan dan diaplikasikan untuk menekan kontaminasi

### **Saran**

Semua hasil asesment tidak akan berdampak positif bila hanya sekedar diketahui tapi tanpa diikuti oleh eksekusi/kegiatan secara langsung untuk merubah, memodifikasi dan meredam terjadinya kontaminasi.

Antisipasi pencapaian tujuan

## Daftar Pustaka

- Balo Y. 2023. Elimination of contamination in plant tissue culture laboratory. *ACTA Botanica Plantae*. 2(3):22–29.
- Bettoni JC, Wang MR, Wang QC. 2024. *In vitro* regeneration, micropropagation and germplasm conservation of horticultural plants. *Horticulturae*. 10(45):1–5.
- Caruso DJ, Palombo EA, Moulton SE, Zaferanloo B. 2022. Exploring the promise of endophytic fungi: a review of novel antimicrobial compounds. *Microorganisms*. 10(10):1–22.
- Chika S, Ismaini L, Armanda DT. 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.
- Karyaningtyas AW, Lestari A, Sandra E. 2023. Pengaruh beberapa formulasi sitokinin terhadap penyediaan bibit dan pertumbuhan eksplan tanaman pule pandak (*Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz) secara *in vitro*. *JURNAL AGROPLASMA*. 10(1):237–251.
- Kushwana A, Gupta P. 2023. Amoxicillin: mechanism of action, pharmacokinetics, and therapeutic implications in bacterial infections. *PEXACY International Journal of Pharmaceutical Science*. 2(6):42–64.
- Sulichantini ED, Nazari APD, Nuansyah A. 2024. Identifikasi kontaminasi kultur jaringan pisang cavendish. *Jurnal Agrotek Tropika*. 12(2):400–409
- Timofeeva S, Tyukalova O, Timofeev S. 2023. Evaluation of the effect of antibiotics on the growth reactions of higher plants - potential phytoremediants. *RUDN Journal of Ecology and Life Safety*. 31(4):556–571.

## **1 Modul Kultur Jaringan Kopi yang sudah dikoreksi**

Muhammad Bima Akzad, S.Hut., M.Hut  
Andi Hardianti, S.Hut., M.Si

### **KATA PENGANTAR**

Modul kultur jaringan ini disusun untuk berbagi pengalaman kami dalam melakukan praktik perbanyakan kopi secara kultur jaringan di laboratorium sederhana yang kami bangun sendiri. Meskipun tidak sepenuhnya berhasil dan sering mengalami kegagalan akibat kontaminasi, setidaknya ada beberapa formula yang kami coba dan menunjukkan potensi keberhasilan.

Pembangunan laboratorium kultur jaringan ini bermula dari kondisi kopi Toraja yang terdampak perubahan iklim, sehingga produksi panen menurun dan tidak menentu. Untuk mengatasi masalah tersebut, kami berupaya menyediakan bibit kopi yang tahan terhadap perubahan iklim sekaligus meremajakan tanaman kopi yang sudah ada. Ternyata, telah tersedia bibit kopi bernama Komasti yang mampu bertahan terhadap perubahan iklim dan berbuah secara stabil. Oleh karena itu, untuk memperbanyak varietas kopi ini, kami memilih metode kultur jaringan.

Melalui kultur jaringan, perbanyakan dapat dilakukan dengan tetap menjaga kualitas indukan. Dengan demikian, kondisi tanaman kopi yang tumbuh nantinya akan sama baiknya dengan tanaman induknya.

Upaya perbanyakan bibit kopi Komasti ini terus kami uji coba sepanjang program berlangsung. Dalam proses uji coba tersebut, kami menghadapi berbagai kendala, mulai dari penyesuaian laboratorium agar memenuhi standar sterilitas, hingga tantangan teknis dalam praktik kultur jaringan itu sendiri.

Namun demikian, pembangunan dan pengembangan kopi Komasti ini mendapat dukungan penuh dari Pemerintah Kabupaten Toraja Utara serta Dinas Pertanian Toraja Utara yang menyediakan tempat untuk dijadikan laboratorium.

## **BAB 1: PENDAHULUAN**

### **Pendahuluan**

Toraja Utara merupakan wilayah strategis yang berperan sebagai penyangga sistem hidrologi regional sekaligus sentra produksi kopi di Sulawesi Selatan. Kondisi agroklimat yang sejuk dengan ketinggian wilayah yang ideal menjadikan daerah ini sangat sesuai untuk budidaya kopi, sehingga komoditas ini menjadi tulang punggung penghidupan masyarakat. Namun, dalam beberapa tahun terakhir, tekanan perubahan iklim semakin nyata dirasakan, ditandai dengan perubahan pola curah hujan, peningkatan intensitas hujan ekstrem, serta kejadian iklim yang tidak menentu yang berdampak langsung terhadap produktivitas dan kualitas tanaman kopi.

Kerentanan tersebut diperkuat oleh kondisi tanaman kopi yang umumnya sudah berusia tua dan semakin tidak adaptif terhadap perubahan lingkungan. Dampak yang muncul antara lain penurunan produksi, kegagalan pembungaan, serta kerusakan buah akibat kelembaban tinggi. Situasi ini menunjukkan bahwa sistem budidaya kopi yang ada saat ini membutuhkan intervensi berbasis inovasi, khususnya dalam penyediaan benih unggul yang adaptif terhadap perubahan iklim. Salah satu varietas yang telah dikembangkan adalah Kopi Andungsari Tiga (Komasti) oleh Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, yang memiliki ketahanan lebih baik terhadap kondisi iklim ekstrem.

Namun, keterbatasan akses terhadap benih unggul menjadi tantangan utama, terutama bagi petani kecil. Harga benih yang relatif tinggi serta keterbatasan sistem perbanyakan konvensional menyebabkan adopsi varietas adaptif berjalan lambat. Dalam konteks ini, teknologi kultur jaringan menjadi solusi strategis karena mampu menghasilkan bibit dalam jumlah besar, seragam, berkualitas tinggi, serta dapat dilakukan secara berkelanjutan dalam waktu relatif singkat. Pendekatan ini juga memungkinkan pengendalian mutu bibit secara lebih baik dibandingkan metode perbanyakan tradisional.

Sebagai respons terhadap kebutuhan tersebut, proyek ini mengembangkan sistem perbanyakan kopi adaptif melalui pembangunan dan operasional laboratorium kultur jaringan di tingkat lokal. Fasilitas ini dirancang untuk memproduksi bibit kopi Komasti secara massal dan berkelanjutan, yang selanjutnya akan didistribusikan kepada anggota Kelompok Usaha Perhutanan Sosial (KUPS) untuk mendukung peremajaan tanaman kopi di lahan mereka. Selain itu, keberadaan laboratorium ini juga menjadi sarana pembelajaran dan penguatan kapasitas lokal dalam penguasaan teknologi perbanyakan tanaman. Proyek ini didanai oleh Republik Korea Selatan melalui Global Green Growth Institute sebagai bagian dari upaya mendorong pembangunan rendah emisi dan ketahanan iklim di tingkat lokal.

Untuk memastikan proses perbanyakan melalui kultur jaringan berjalan secara konsisten, efisien, dan memenuhi standar kualitas, diperlukan pedoman teknis yang terstruktur dan mudah diterapkan. Oleh karena itu, modul ini disusun sebagai panduan operasional dalam pelaksanaan kultur jaringan kopi adaptif, mulai dari tahap persiapan hingga aklimatisasi bibit. Modul ini diharapkan tidak hanya menjadi acuan teknis, tetapi juga menjadi instrumen penting dalam mendukung kemandirian petani, peningkatan produktivitas kopi, serta penguatan ketahanan masyarakat terhadap dampak perubahan iklim.

## **BAB 2: TINJAUAN PUSTAKA SINGKAT**

### **A. Kopi Arabika Toraja**

Kopi arabika berasal dari Afrika dan dibudidayakan pertama kali di Yaman, sejak abad ke-6, kemudian kopi arabika diperkenalkan di India, Asia Tenggara, Amerika Latin, dan Afrika timur selama abad ke-17-hingga ke-19. Varietas kopi arabika sebagian besar berasal dari kultivar kuno, di antara varietas tersebut kopi "*Mocha Yamen*" melahirkan dua tipe botani yaitu arabika varietas bourbon, yang mencapai Amerika Selatan dan varietas typica, dibudidayakan di Amerika Latin dan Asia termasuk India dan kemudian Indonesia. Kopi Typica ini dikenal oleh masyarakat Toraja sebagai kopi lokal karena varietas ini yang pertama kali dibudidayakan di Toraja.

Pada masa awal pengembangannya, kopi Toraja ditanam secara terpadu bersama tanaman pangan dan hortikultura lainnya dalam sistem agroforestri sederhana. Petani Toraja menanam kopi di bawah naungan pohon-pohon besar, yang secara tidak langsung membentuk karakter kopi Toraja yang kini dikenal memiliki body penuh dan keasaman rendah hingga sedang. Praktik pertanian tradisional ini diwariskan secara turun-temurun dan menjadi bagian tak terpisahkan dari budaya agraris masyarakat Toraja.

Perkembangan signifikan terjadi pada dekade 1970-an ketika perusahaan kopi asal Jepang, Toarco Jaya, bermitra dengan perusahaan lokal untuk membangun perkebunan kopi Toraja yang lebih terorganisasi dan modern. Toarco Jaya berperan penting dalam memperkenalkan standar kualitas internasional, membangun infrastruktur pengolahan, serta membuka jalur ekspor langsung ke pasar Jepang. Kolaborasi ini menjadikan Kopi Toraja terkenal di kalangan penikmat kopi Jepang dan meletakkan dasar bagi reputasi internasional kopi Toraja sebagai kopi premium (Neilson, 2007).

Seiring meningkatnya permintaan global terhadap kopi spesialti pada era 1990-an hingga 2000-an, Kopi Toraja semakin mendapat perhatian dari buyer internasional. Banyak roastery dan kafe di Amerika Serikat dan Eropa mulai memasukkan Kopi Toraja dalam menu single origin mereka. Perkembangan gelombang ketiga kopi (third wave coffee movement) turut berkontribusi pada meningkatnya apresiasi konsumen global terhadap keunikan dan kompleksitas rasa Kopi Toraja.

## **B. Kultur Jaringan Tanaman**

Kultur jaringan merupakan suatu cara atau metode untuk mengisolasi bagian tanaman khususnya jaringan, sekelompok sel yang ditumbuhkan dengan lingkungan tumbuh aseptik atau steril (dalam botol kultur) pada media nutrisi yang mengandung hormon pengatur tumbuh sehingga tanaman dapat tumbuh dan memperbanyak diri menjadi tanaman lengkap seperti induknya. Teknologi tersebut bermula dari spekulasi Gottlieb Haberlandt mengenai totipotensi sel pada awal abad ke-20. Beliau mempostulasikan bahwa apabila kondisi lingkungan dan nutrisi sel-sel yang dikulturkan dimanipulasi maka sel-sel tersebut akan melangsungkan sekuen-sekuen perkembangan seperti pertumbuhan tanaman normal. Saat ini teknik kultur jaringan tanaman telah berkembang menjadi alat yang ampuh, tidak saja untuk memperbanyak klonal, tetapi juga untuk pemuliaan berbagai tanaman yang memiliki nilai ekonomi (Zulkarnain, 2009).

Tujuan dari penggunaan teknik kultur jaringan adalah untuk memperbanyak tanaman dengan waktu yang lebih singkat. Kegunaan kultur jaringan di antaranya untuk memproduksi bibit dalam jumlah besar yang mempunyai sifat unggul, bebas virus, metabolit sekunder, pelestarian plasma nutfah yang hampir punah, percepatan pemuliaan tanaman, termasuk rekayasa genetika tanaman. Meskipun pada prinsipnya semua jenis sel dapat ditumbuhkan, namun untuk kultur jaringan sebaiknya dipilih bagian tanaman yang masih muda agar lebih cepat tumbuh. Bagian yang mudah tumbuh adalah bagian meristem, organ tanaman yang sifat pertumbuhannya agresif, misalnya daun muda, ujung akar, keping biji, dan lain-lain (Yuliarti, 2010).

Secara umum, tahapan dalam kultur jaringan tanaman meliputi beberapa tahap utama, yaitu pemilihan dan persiapan eksplan, sterilisasi eksplan, penanaman eksplan pada media inisiasi, subkultur untuk multiplikasi tunas, pengakaran, aklimatisasi, dan pemindahan ke lapangan. Setiap tahapan tersebut memerlukan kondisi lingkungan yang terkontrol, termasuk suhu, intensitas cahaya, kelembaban, serta komposisi media yang tepat. Keberhasilan setiap tahapan sangat bergantung pada ketepatan prosedur yang dilakukan, sehingga standar operasional yang baku dan terperinci menjadi prasyarat mutlak dalam setiap kegiatan laboratorium kultur jaringan (George, Hall, & De Klerk, 2008)

## **C. Kultur Jaringan Kopi**

Perbanyak kopi secara in vitro umumnya dilakukan melalui beberapa jalur, antara lain organogenesis, embriogenesis somatik, dan multiplikasi tunas aksilar. Di antara metode tersebut, embriogenesis somatik merupakan metode yang paling banyak dikembangkan untuk memperbanyak kopi secara massal karena mampu menghasilkan jumlah bibit yang sangat banyak dalam waktu singkat dengan tingkat keseragaman genetik yang tinggi (Etienne, Anthony, Dussert, Fernandez, Lashermes, & Bertrand, 2002).

Keberhasilan kultur jaringan kopi sangat ditentukan oleh beberapa faktor kritis, di antaranya adalah jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh yang digunakan, komposisi media dasar, kondisi sterilisasi, serta sumber eksplan yang digunakan.

Media yang umum digunakan dalam kultur jaringan kopi adalah media Murashige dan Skoog (MS) yang dimodifikasi sesuai dengan kebutuhan spesifik dari genotipe kopi yang diperbanyak. Penggunaan auksin seperti 2,4-D dan sitokinin seperti BAP (Benzylaminopurine) dalam kombinasi dan konsentrasi yang tepat terbukti berperan penting dalam menginduksi pembentukan kalus dan regenerasi tunas pada tanaman kopi (Hatanaka, Yasuda, Uchida, & Iwamasa, 1999). Penelitian lebih lanjut oleh Söndahl dan Sharp (1977) juga menunjukkan bahwa frekuensi embriogenesis somatik pada kopi dipengaruhi secara signifikan oleh konsentrasi sukrosa dan nitrogen dalam media kultur.

Salah satu tantangan terbesar dalam kultur jaringan kopi adalah tingginya tingkat kontaminasi oleh mikroorganisme, terutama jamur dan bakteri, yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan bahkan menyebabkan kegagalan total pada kultur. Oleh karena itu, prosedur sterilisasi yang ketat dan kondisi kerja aseptik yang terjaga dengan baik menjadi kunci keberhasilan dalam setiap tahapan kultur jaringan kopi. Selain itu, proses aklimatisasi bibit hasil kultur jaringan juga memerlukan perhatian khusus karena bibit yang tumbuh dalam kondisi *in vitro* memiliki karakteristik morfologis dan fisiologis yang berbeda dengan bibit konvensional, sehingga membutuhkan adaptasi bertahap sebelum dapat dipindahkan ke lapangan (Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia/Puslitkoka, 2006). Penelitian Priyono (2010) juga menegaskan bahwa keberhasilan aklimatisasi bibit kopi hasil kultur jaringan sangat bergantung pada tingkat kelembaban lingkungan dan media tanam yang digunakan selama masa transisi dari kondisi *in vitro* ke kondisi *ex vitro*.



## BAB 3: FASILITAS, PERLENGKAPAN, DAN STERILISASI LABORATORIUM

### 3.1 Persiapan Alat dan Bahan

#### Alat

| Glassware                                                                                    | Instruments & Tools                                                                                                                                    | Major Equipment                                                                              | Measurement & Preparation                           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Petri Dish<br>Beaker<br>Erlenmeyer Flask<br>Measuring Cylinder<br>Duran Bottle<br>Jar Bottle | Scalpel<br>Angle Forceps<br>Long Forceps<br>Short Forceps<br>Scissors<br>Horn Spoon<br>Plant Scissors<br>Spirit Lamp<br>Micropipette Stand<br>pH Meter | Autoclave<br>Laminar Air Flow<br>Laboratory Oven<br>Water Distiller<br>Showcase<br>Microwave | Analytical Balance<br>Hot Plate<br>Magnetic Stirrer |

#### Bahan

### Laboratory Materials Classification

| No.                                                    | Item                         | Full Chemical Name                   | Chemical Formula                                                   |
|--------------------------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>CONSUMABLES &amp; PERSONAL PROTECTIVE EQUIPMENT</b> |                              |                                      |                                                                    |
| 1                                                      | Face mask                    | Surgical mask or N95 respirator      | —                                                                  |
| 2                                                      | Gloves (handscoon)           | Latex or nitrile examination gloves  | —                                                                  |
| 3                                                      | Lens tissue (1 roll)         | Lens cleaning tissue / Optical wipes | —                                                                  |
| 4                                                      | Laboratory tissue            | Lab wipes / Kimwipes                 | —                                                                  |
| 5                                                      | Micropipette tips 0.1–10 µL  | XS micropipette tips                 | —                                                                  |
| 6                                                      | Micropipette tips 20–200 µL  | M micropipette tips                  | —                                                                  |
| 7                                                      | Micropipette tips 1000 µL    | XL micropipette tips (1 mL)          | —                                                                  |
| 8                                                      | Wrapping plastic             | Parafilm M / Cling wrap              | —                                                                  |
| <b>STERILISATION &amp; CLEANING AGENTS</b>             |                              |                                      |                                                                    |
| 9                                                      | Spiritus (denatured alcohol) | Denatured Ethanol                    | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH + colorant                        |
| 10                                                     | NaOCl — Bayclean             | Sodium Hypochlorite                  | NaOCl                                                              |
| 11                                                     | Alcohol 96%                  | Ethanol 96%                          | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH                                   |
| 12                                                     | Alcohol 70%                  | Ethanol 70% / Isopropyl Alcohol      | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH / C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O |
| 13                                                     | Sunlight (dish soap)         | Laboratory-grade detergent           | —                                                                  |

|                                                  |                              |                                                   |                                       |
|--------------------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 14                                               | PPM                          | Plant Preservative Mixture                        | —                                     |
| 15                                               | Bactericide — Agrept         | Streptomycin Sulphate 20 WP                       | $C_{21}H_{39}N_7O_{12} \cdot H_2SO_4$ |
| 16                                               | Fungicide — Masalgin         | Benomyl 50 WP / Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate | $C_{14}H_{18}N_4O_3$                  |
| <b>BASAL MEDIA COMPONENTS &amp; pH ADJUSTERS</b> |                              |                                                   |                                       |
| 17                                               | Agar                         | Agar/Polysaccharide gelling agent                 | $(C_{12}H_{18}O_9)_n$                 |
| 18                                               | Sucrose (Gulaku / Rosebrand) | Sucrose / Saccharose                              | $C_{12}H_{22}O_{11}$                  |
| 19                                               | B-1                          | Thiamine Hydrochloride / Vitamin B1               | $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$       |
| 20                                               | HCl                          | Hydrochloric Acid                                 | HCl                                   |
| 21                                               | NaOH / Sodium Hydroxide      | Sodium Hydroxide                                  | NaOH                                  |

## MURASHIGE & SKOOG STOCK

| Stock Group | Chemical Formula                | Full Name                       | Element / Nutrient   |
|-------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Macro       | $KNO_3$                         | Potassium Nitrate               | $K^+, NO_3^-$        |
|             | $NH_4NO_3$                      | Ammonium Nitrate                | $NH_4^+, NO_3^-$     |
|             | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$            | Magnesium Sulphate Heptahydrate | $Mg^{2+}, SO_4^{2-}$ |
|             | $KH_2PO_4$                      | Potassium Dihydrogen Phosphate  | $K^+, H_2PO_4^-$     |
| Micro       | KI                              | Potassium Iodide                | $I^-$                |
|             | $MnSO_4$                        | Manganese(II) Sulphate          | $Mn^{2+}$            |
|             | $ZnSO_4$                        | Zinc Sulphate                   | $Zn^{2+}$            |
|             | $H_3BO_3$                       | Boric Acid                      | B                    |
|             | $Na_2MoO_4$                     | Sodium Molybdate                | Mo                   |
|             | $CoCl_2$                        | Cobalt(II) Chloride             | $Co^{2+}$            |
|             | $CuSO_4$                        | Copper(II) Sulphate             | $Cu^{2+}$            |
| Fe-EDTA     | $FeSO_4$                        | Iron(II) Sulphate               | $Fe^{2+}$            |
|             | $Na_2EDTA$                      | Disodium EDTA                   | —                    |
| Vitamin     | $C_{12}H_{17}ClN_4OS \cdot HCl$ | Thiamine HCl (Vitamin B1)       | Cofactor             |

|  |                                                     |                             |  |                   |
|--|-----------------------------------------------------|-----------------------------|--|-------------------|
|  | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>       | Glycine                     |  | N metabolism      |
|  | C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>       | Nicotinic Acid (Vitamin B3) |  | Cofactor          |
|  | C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ·HCl | Pyridoxine HCl (Vitamin B6) |  | Cofactor          |
|  | C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>       | Myo-Inositol                |  | Membrane / signal |

## PLANT GROWTH REGULATORS

| Class       | Code            | Full Chemical Name             | Formula                                                      | Primary Role                        |
|-------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Cytokinin   | Kinetin         | 6-Furfurylaminopurine          | C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O              | Cell division, shoot multiplication |
|             | BAP             | 6-Benzylaminopurine            | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub>               | Axillary shoot induction            |
| Auxin       | 2,4-D           | 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Callus induction                    |
|             | IAA             | Indole-3-Acetic Acid           | C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>               | Elongation & rooting                |
|             | NAA             | α-Naphthaleneacetic Acid       | C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>               | Adventitious root induction         |
| Gibberellin | GA <sub>3</sub> | Gibberellic Acid               | C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>               | Internode elongation, germination   |

### 3.1. Layout dan Fasilitas Laboratorium Yaku-Payopayo

Laboratorium Yaku-Payopayo menerapkan sistem aliran kerja linear satu arah dengan gradasi kebersihan dari area terkotor ke area terbersih. Desain ini bertujuan meminimalkan risiko kontaminasi silang dan memastikan efisiensi kerja.

#### 1. RUANG TRANSIT (Buffer Zone)

- Status Kebersihan: "Kotor" - Area peralihan dari luar ke dalam lab.
- Fasilitas:
  - Loker Pribadi: Untuk menyimpan barang pribadi (tas, jaket, dll)
  - WC & Wastafel Umum: Dilengkapi sabun antiseptik dan pengering tangan
  - Dapur Mini: Area khusus untuk makan/minum
- Aturan Operasional:
  - Dilarang membawa makanan/minuman keluar dari zona ini
  - Pakai sepatu lab sebelum meninggalkan zona
  - APD laboratorium TIDAK boleh dipakai di zona ini

#### 2. RUANG PREPARASI (Media & Sterilisasi)

Ruang preparasi adalah area kerja di laboratorium kultur jaringan yang berfungsi sebagai tempat penyiapan semua bahan dan peralatan sebelum proses penanaman dilakukan. Di ruang ini dilakukan kegiatan pembuatan media kultur, sterilisasi alat dan bahan, serta persiapan sterilisasi eksplan bahan tanam. Ruang ini merupakan fondasi keberhasilan seluruh rangkaian kegiatan kultur jaringan. Luas dari ruangan preparasi Laboratorium kultur jaringan adalah 10 m x 3 m.

### **Area dan Tata Letak**

Ruang preparasi pada laboratorium Yaku Payo-Payo ini dibagi menjadi beberapa area fungsional yaitu:

#### **1) Area Sterilisasi :**

Fasilitas yang ada pada area ini bertujuan untuk mensterilisasikan bahan dan alat kultur jaringan

- Autoklaf 50-Liter: Posisi minimal 30 cm dari dinding
- Oven 150-Liter: Suhu maksimal 250°C
- Microwave: Kapasitas 20 liter untuk pelelehan media
- Ventilasi Khusus: Exhaust fan untuk pembuangan uap panas

#### **2) Area Pembuatan Media :**

Pada area ini laboran melakukan kegiatan menimbang bahan kimia, menyiapkan larutan stok, dan mencampur komponen media. Area ini memiliki beberapa alat yaitu:

- Meja Kerja: Berbahan kayu
- Timbangan Analitik: Akurasi 0.0001g, di atas meja anti-getar
- Hotplate Magnetic Stirrer: 1 unit dengan pemanas hingga 300°C
- pH Meter Digital: Akurasi  $\pm 0.01$

#### **3) Area Penyimpanan**

- Showcase Bahan Kimia: 1 unit dengan pengunci
- Lemari Rak: menyimpan bahan dan alat

#### **4) Area Pencucian**

Area ini khusus untuk mencuci peralatan yang telah digunakan, pembersihan eksplan pada awal tahapan sterilisasi, serta tempat pengeringan alat.

- Wastafel Stainless Steel: Dilengkapi sabun anti-bakteri dan sikat berbagai ukuran
- Rak Pengering: Material stainless steel, kapasitas minimal 50 alat

#### 4: RUANG MENANAM/INOKULASI (Clean Room Class 1000)

Ruang menanam atau ruang inokulasi adalah area paling kritis dalam laboratorium kultur jaringan. Seluruh kegiatan penanaman eksplan ke media steril dilakukan secara aseptik di ruang ini, yaitu bebas dari kontaminasi mikroorganisme. Keberhasilan kultur jaringan sangat bergantung pada kondisi ruangan ini, karena satu kesalahan kecil dapat menyebabkan kontaminasi yang merusak seluruh kultur.

Area Kerja LAFC:

- Laminar Air Flow Cabinet (LAFC): 2 unit, spesifikasi:
  - Ukuran kerja: 120cm x 60cm x 60cm
  - Filter: HEPA H14 (99.995% pada 0.3µm)
  - Kecepatan udara: 0.45 m/s ± 20%
  - Lampu UV: 30 watt, dengan safety interlock
- Kursi Operator: Hydraulic, tinggi dapat diatur
- Trolley Stainless Steel: 1 tingkat untuk media dan alat

#### Prinsip Kerja Aseptik

Seluruh kegiatan di ruang menanam harus mengikuti prinsip **aseptik ketat**, yaitu:

- 1) **Sterilisasi Permukaan LAF** Sebelum bekerja, semua permukaan bagian dalam LAF disemprot alkohol 70% dan dilap bersih. Lampu UV dinyalakan minimal 1 jam sebelum digunakan, kemudian dimatikan saat pekerja mulai bekerja (lampu UV berbahaya bagi mata dan kulit).
- 2) **Sterilisasi Alat Kerja** Pinset dan scalpel dicelupkan ke dalam alkohol 96%, kemudian dibakar diatas bunsen burner dan dibiarkan dingin sejenak sebelum digunakan. Proses ini diulang setiap kali berpindah dari satu eksplan ke eksplan lain untuk mencegah kontaminasi silang.
- 3) **Sterilisasi Tangan dan Pakaian Pekerja** Pekerja wajib mengenakan jas laboratorium bersih, masker, dan sarung tangan steril. Tangan dan sarung tangan disemprot alkohol 70% sebelum memasukkan tangan ke dalam LAF. Rambut harus tertutup hairnet atau topi.
- 4) **Alur Kerja Searah** Semua benda yang masuk ke dalam LAF harus sudah steril. Gerakan tangan di dalam LAF tidak boleh melewati area yang telah steril, dan pekerja tidak boleh berbicara, bersin, atau batuk menghadap ke dalam kabinet.

#### 5. RUANG INKUBASI (Culture Room)

Ruang inkubasi adalah area khusus eksplan atau kultur jaringan tanaman diinkubasi dalam kondisi lingkungan terkontrol untuk mendukung pertumbuhan planlet.

#### Kondisi Lingkungan Standar

| Parameter | Nilai Umum |
|-----------|------------|
|-----------|------------|

|                  |                                                |
|------------------|------------------------------------------------|
| Suhu             | 25 ± 2°C (dapat bervariasi tergantung spesies) |
| Fotoperiode      | 16 jam terang dan 8 jam gelap                  |
| Intesitas cahaya | 1.000-3.000 lux                                |
| Kelembaban       | 50-70%                                         |

### Peralatan Utama

- Rak kultur, rak bertingkat dari stainless steel atau aluminium yang dilengkapi lampu di setiap tingkat. Ukuran rak yaitu 180cm (T) x 100cm (L) x 50cm (D), kapasitas 1000 per rak
- Timer otomatis- mengatur siklus terang-gelap
- AC- menjaga suhu stabil
- Termometer- pemantauan suhu dan kelembaban

### Persyaratan Ruangan

1. Isolasi termal dinding dan langit langit sebaiknya berinsulasi untuk menjaga suhu stabil
2. Kebersihan lantai epoksi atau keramik yang mudah dibersihkan serta dinding dicat dengan cat anti jamur
3. Sirkulasi udara ventilasi terbatas untuk meminimalkan kontaminasi namun tetap ada pertukaran udara terkontrol
4. Akses terbatas pintu dengan penutup otomatis dan hanya personel terlatih yang boleh masuk
5. Pencatatan log harian suhu kelembaban dan kondisi kultur

### 3.3. Perlengkapan Wajib Laboran/Operator:

Tujuan: Melindungi operator dan kultur dari kontaminasi silang.

Prosedur Berpakaian dan Masuk Area Kerja:

1. Di Ruang Ganti: Lepas semua perhiasan (cincin, gelang, jam tangan).
2. Pakaian Dasar: Gunakan pakaian bersih dan tertutup. Kenakan sepatu khusus lab atau sepatu tertutup.
3. Cuci Tangan: Basahi tangan, gunakan sabun antiseptik, gosok selama 20 detik (ikuti teknik cuci tangan medis), keringkan dengan handuk sekali pakai atau pengering udara.
4. Memakai APD (secara berurutan):  
 Jas Lab Lengan Panjang: Berwarna putih, dari bahan mudah dibersihkan, terkancing rapi.  
 Masker: Masker wajah (surgical mask) untuk menutupi hidung dan mulut.  
 Pelindung Rambut: Tutup rambut dengan bouffant cap atau helm lab.  
 Sarung Tangan: Sarung tangan lateks/vinil/nitril sekali pakai. *Pastikan tidak alergi.*

5. Masuk ke Ruang Inokulasi: Hanya personel ber-APD lengkap yang boleh masuk. Semprot sol sepatu dengan disinfektan di alas kaki di depan pintu.

### 3.3. Prosedur Sterilisasi Umum:

#### 3.3.1. Sterilisasi Alat dengan Autoklaf

Prinsip: Sterilisasi dengan uap air panas bertekanan (121°C, 2 atm) selama waktu tertentu.

##### A. Sterilisasi Alat Logam (Pinset, Skalpel, Gunting):

1. Pembersihan Awal: Cuci alat dengan sabun dan air, bilas, keringkan.
2. Pembungkusan: Bungkus alat menggunakan kertas bekas.
3. Penyusunan di Autoklaf: Letakkan bundle alat di dalam rack, jangan terlalu padat agar uap panas dapat bersirkulasi.
4. Pengaturan Parameter:
  - Mode: **STERILIZATION** atau **GRAVITY**
  - Suhu: setelah mencapai 121°C turunkan suhu
  - Waktu: 20 - 30 menit (mulai hitung setelah suhu mencapai 121°C).
5. Pendinginan & Penyimpanan: Setelah selesai dan tekanan kembali ke nol, buka katup pengeluaran uap perlahan. Keluarkan alat dan simpan di oven bersuhu 60°C atau dalam LAFC yang bersih hingga kering dan siap digunakan.

##### B. Sterilisasi Media, Air, dan Larutan:

**Pengisian:** Isi media/larutan ke dalam wadah (Erlenmeyer, botol kultur) maksimal 2/3 volumenya.

**Penutupan:** Tutup dengan tutup plastik yang tidak dikencangkan rapat (dikendurkan ¼ putaran) agar udara dan uap dapat keluar-masuk.

**Penyusunan:** Letakkan wadah tegak di dalam rack.

##### **Pengaturan Parameter:**

- Mode: Liquid atau Slow Exhaust
- Suhu: 121°C
- Tekanan: 15-20 psi
- Waktu Tahan: 15-20 menit (untuk volume 500-1000 ml). Waktu lebih lama untuk volume lebih besar.

**Pendinginan:** Setelah selesai, biarkan tekanan turun ke nol secara alami. Jangan buka katup cepat-cepat agar media tidak mendidih dan tumpah. Setelah tekanan nol, kencangkan tutup botol dan keluarkan media. Dinginkan pada suhu ruang sebelum digunakan.

##### C. Sterilisasi Kain (Untuk Lap Dalam LAFC):

- Bungkus kain katun bersih dalam aluminium foil.
- Sterilkan bersama alat logam (121°C, 20 menit).

### 3.3.2. Sterilisasi Alat dengan Oven

Setelah sterilisasi autoklaf kemudian masukkan ke dalam oven, alat yang dimasukkan itu pinset, gunting, scalpel, cawan petri, botol, dan alat yang tahan panas kering. Suhu oven sekitar 150-180°C, selama 2 jam.

Prinsip: Sterilisasi panas kering, cocok untuk alat gelas dan bahan yang tidak rusak oleh panas tinggi tetapi dapat rusak oleh uap.

Prosedur:

1. Botol kultur, cawan, pinset, dll yang telah diautoklaf
2. Penyusunan: Masukkan ke dalam oven. Jangan menumpuk terlalu rapat.
3. Pengaturan Parameter:
  - Suhu: 60°C - 180°C
  - Waktu: 60 - 120 menit (minimal 1 jam setelah oven mencapai suhu target).
4. Pendinginan: Matikan oven dan biarkan alat mendingin di dalam hingga suhu turun di bawah 80°C sebelum dikeluarkan, untuk mencegah retak dan kontaminasi oleh udara yang masuk.

## 3.4. Prosedur Sterilisasi Ruang Kerja:

### 3.4.1. Sterilisasi Rutin

Sterilisasi rutin ruangan kerja merupakan langkah krusial dalam laboratorium kultur jaringan tanaman kopi untuk menciptakan lingkungan aseptik yang bebas dari kontaminasi mikroorganisme seperti jamur, bakteri, dan spora yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan.

#### 1. Persiapan sebelum kerja

- Nyalakan lampu UV di ruangan kerja dan LAF selama 15–30 menit
- Lap permukaan LAF, meja, dan dinding sekitar dengan alkohol 70%

#### 2. Selama bekerja

- Semprotkan alkohol 70% ke sarung tangan secara berkala
- Hindari gerakan cepat dan bicara berlebihan untuk mengurangi kontaminasi udara

#### 3. Setelah selesai kerja

- Bersihkan semua permukaan kerja dengan alkohol 70% atau desinfektan (klorin 0,5%)
- Buang limbah kontaminan dalam wadah tertutup



#### 4. Sterilisasi periodik (mingguan/bulanan)

- Fumigasi ruangan dengan formalin 40% +  $\text{KMnO}_4$  atau gunakan ozon/UV-C
- Cuci lantai dengan desinfektan

#### 3.4.2. Maintenance Bulanan:

Prosedur bulanan ini bertujuan mengendalikan mikroba di area yang tidak terjangkau pembersihan harian. Jadwal tetap: sekali sebulan, idealnya di akhir pekan sebelum libur.

Sebelum penyemprotan:

- Pindahkan semua botol kultur ke ruang inkubasi
- Tutup permukaan terbuka dan simpan alat kecil dalam lemari
- Operator wajib menggunakan APD: masker N95, sarung tangan karet, apron plastik

Disinfektan yang digunakan:

- Natrium Hipoklorit (Bayclin) 10% (100 ml + air hingga 1000 ml)
- Atau disinfektan komersial sesuai petunjuk

Selama penyemprotan:

- Semprot merata ke lantai, dinding (hingga 2m), langit-langit, bawah meja, dan permukaan luar peralatan
- Hindari panel elektronik dan sirkuit LAFC
- Waktu kontak minimal 30 menit

Setelah penyemprotan:

- Buka pintu & jendela untuk ventilasi
- Biarkan mengering alami
- Lantai dapat dipel dengan air bersih
- Catat tanggal, jenis disinfektan, & nama pelaksana di checklist bulanan

Tambahan (jika kontaminasi tinggi):

- Penyemprotan formalin setiap 3 bulan sekali
- Dilakukan di ruang inkubasi & ruang penanaman, pada sudut rak kultur, sudut LAFC, dan sudut ruangan
- Gunakan APD lengkap (baju APD, masker, sarung tangan lateks)

## **BAB 4: MEDIA KULTUR**

### **4.1. Prosedur Pembuatan Media Kultur**

#### **A. Persiapan Larutan Stok**

1. Siapkan larutan MS stok (A,B,C,D,E,F,G) sesuai formula media yang digunakan
2. Siapkan aquades steril
3. Siapkan larutan stok ZPT ( auksi: IAA/IBA/NAA; sitokinin: BAP/Kinetin, dll) sesuai tanaman target
4. Siapkan HCl dan NaOH
5. Simpan semua larutan stok di showcase untuk digunakan dalam 1-3 bulan

#### **B. Pencampuran dan Penyiapan Media**

1. Siapkan aquades steril dan gelas beaker
2. Tuang aquades 200mL ke dalam gelas beaker di atas magnetic stirrer
3. Masukkan larutan stok sesuai takaran formula
4. Tambahkan sukrosa 30g/L dan larutkan hingga homogen
5. Tambahkan aquades steril sesuai takaran formula
6. Tambahkan ZPT ke dalam larutan menggunakan mikropipet sebanyak 1ppm/L atau sesuai dengan takaran formula
7. Ukur dan atur pH media pada kisaran 5,6-5,8 menggunakan pH meter. Jika lebih dari 5,8 tambahkan Hcl dan jika kurang dari 5,6 tambahkan NaOH
8. Tambahkan agar 6-8 g/L hingga larut
9. Masukkan larutan ke dalam microwave dengan suhu paling tinggi selama 30 menit atau sampai mendidih
10. Tuang media ke dalam botol kultur (volume 25-30 mL per botol) dalam keadaan cair.
11. Tutup botol dengan tutup plastik yang tahan panas

#### **C. Sterilisasi Media**

1. Susun botol-botol berisi media dalam keranjang autoklaf
2. Pastikan autoklaf dalam kondisi baik dan berisi air pada level yang tepat
3. Atur suhu 121 C durasi waktu 15-20 menit
4. Setelah siklus selesai biarkan tekanan turun alami sebelum membuka tutup autoklaf
5. Simpan media steril di ruang inkubasi dan tunggu sampai 3 hari untuk padat

### **4.2. Media MS + Zat Pengatur Tumbuh (ZPT):**

#### **4.2.1. Jenis dan Fungsi ZPT**

Penambahan ZPT dilakukan agar tanaman mendapatkan rangsangan untuk tumbuh, ZPT ini diatur sesuai dengan fokus tumbuhnya.

Auksin yaitu IAA/NAA untuk induksi akar, Sitokinin yaitu BAP/Kinetin untuk induksi tunas, 2,4D yang termasuk hormon auksin ini berfokus pada pembelahan sel, dan giberelin untuk pertumbuhan planlet. Penambahan zat hormon dilakukan pada tahap setelah menuangkan hara makro mikro ke dalam larutan, pengambilan dilakukan menggunakan mikropipet

#### **4.2.2. Formulasi Media:** Resep spesifik untuk setiap tahap:

- Inisiasis: MS + BAP (1 mg/L) + NAA (0.1 mg/L).
- Multiplikasi: MS + BAP (2-3 mg/L).

- Perakaran:  $\frac{1}{2}$  MS + NAA atau IBA (1-2 mg/L).

**4.2.3. Prosedur Pembuatan:** Cara membuat stok induk ZPT (biasanya 1 mg/mL), penyimpanan, dan teknik pengenceran/pemipetan yang akurat ke dalam media steril atau sebelum sterilisasi.

## DAFTAR GAMBAR



Bambar 1. Rapat pembukaan dengan seluruh komponen terdiri dari tim inti, pembina, anggota tim, mahasiswa magang.



Gambar 2. Dokumentasi bersama setelah pembukaan asesement





Gambar 3. Penyerahan sertifikat setelah acara asesment selesai



Gambar 3. Foto bersama dengan Dewan Pembina. Prof Halimah dari Universitas Hasanudin



Gambar 4. Foto bersama tim inti Aku Rimba Indonesia



Gambar 5. Rapat asesi dengan semua tim proyek kultur jaringan Koi Toraja





Gambar 6. Asesi bersama Pembina dari Universitas Hasanudin Dr Mustika



Gambar 7. Rapat Asesi bersama Pembina dari Universitas Hasanudin, Ketua proyek dan kepala Laboratorium kultur jaringan Mas Bima.



Gambar 8. Kunjungan ke pembibitan kopi adatif