

**PENGARUH PENAMBAHAN ELISITOR KITOSAN DALAM
MENGURANGI KONTAMINASI MIKROBA PADA KULTUR KALUS KOPI
ARABIKA *Coffea arabica* L. SECARA *IN VITRO***



HASNAWATI

H041201007



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**PENGARUH PENAMBAHAN ELISITOR KITOSAN DALAM
MENGURANGI KONTAMINASI MIKROBA PADA KULTUR KALUS KOPI
ARABIKA *Coffea arabica* L. SECARA *IN VITRO***

HASNAWATI
H041 20 1007



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**PENGARUH PENAMBAHAN ELISITOR KITOSAN DALAM
MENGURANGI KONTAMINASI MIKROBA PADA KULTUR KALUS KOPI
ARABIKA *Coffea arabica* L. SECARA *IN VITRO***

HASNAWATI
H041201007

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI**PENGARUH PENAMBAHAN ELISITOR KITOSAN DALAM
MENGURANGI KONTAMINASI MIKROBA PADA KULTUR KALUS
KOPI ARABIKA *Coffea arabica* L. SECARA *IN VITRO*****HASNAWATI****H041201007**

Skripsi,

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada 24 Juni 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama




Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si
NIP. 196702071991031001

Pembimbing Pertama



Prof. Dr. Fahrudin, M.Si
NIP. 196509151991031002

Mengetahui
Ketua Program Studi

Dr. Magdalena Litaay, M.Sc.
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA ILMIAH DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, karya ilmiah berjudul "Pengaruh Penambahan Elisitor Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi Mikroba pada Kultur Kalus Kopi Arabika *Coffea arabica* L. secara *In Vitro*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Fahrudin, M.Si sebagai Pembimbing pertama saya. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 07 Mei 2024



UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucapkan *Alhamdulillah* *rabbi' alamin*, Segala puji dan syukur penulis panjatkan atas kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada Baginda Rasulullah SAW dan Rasul yang telah mengantarkan manusia dari zaman jahiliyah menuju zaman yang terang benderang seperti saat ini.

Skripsi dengan judul **“Pengaruh Penambahan Elisitor Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi Mikroba pada Kultur Kalus Kopi Arabika *Coffea arabica* L. secara *In Vitro*”** disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penyusunan skripsi ini. Untuk itu penulis mengharapkan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini.

Selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari dari dukungan berbagai pihak. Ucapan terima kasih yang teramat dalam kepada semua pihak yang terlibat dengan penuh suka cita memberikan doa, semangat, dan motivasi selama proses pencapaian gelar sarjana. Dengan segala kerendahan hati penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya terkhusus kepada kedua orang tua penulis, Ibunda tercinta Herlina dan Ayahanda tercinta Baharuddin serta saudara penulis Wandu yang senantiasa setulus hati menyayangiku tanpa batas, berdoa untukku tiada henti dan mendukungku setiap saat. Terima kasih telah menjadi sumber kebahagiaan Penulis.

Dengan segenap kerendahan hati penulis ucapkan salam hormat dan beribu ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Dr. Andi Ilham Latunra M.Si. selaku pembimbing utama dan Bapak Prof. Dr. Fahrudin, M.Si selaku dosen pembimbing pertama penulis yang telah banyak meluangkan waktunya dalam memberikan bimbingan dan motivasi yang berharga dalam penyusunan skripsi ini. Tentunya dalam proses penelitian skripsi ini, penulis banyak mendapatkan kendala dan hambatan. Oleh karena itu, terima kasih kepada kedua pembimbing penulis yang selalu memberikan solusi sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Hasanuddin, Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Si., beserta jajarannya.
2. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi. Terima kasih atas motivasi yang diberikan kepada penulis selama menimba ilmu.
4. Bapak Dr. Eddyman W. Ferial, M.Si. Selaku dosen Penasehat Akademik sekaligus dosen penguji penulis. Terima kasih atas segala perhatian, saran dan bimbingan dalam pengembangan akademik penulis. Terima kasih juga kepada Bapak Drs. Muh. Ruslan Umar, M.Si selaku dosen penguji penulis yang telah banyak memberikan kritik dan saran demi kemajuan skripsi penulis.

5. Seluruh Bapak/Ibu dosen Program Studi Biologi yang telah memberikan ilmunya dan mengajarkan banyak hal selama proses perkuliahan. Terima kasih kepada staff pegawai yang banyak membantu dalam proses administrasi.
6. Sahabatku tercinta Melati Reski Wulandari, Rivaldi Pratama, S.Si, Adiatna Ayu Kamila, Rahmawati dan Nurul Amalia. Terima kasih atas setiap momen suka dan duka yang dilakukan bersama. Terima kasih atas dukungan, ketulusan dan kehadiran setia dalam setiap langkah penulis. Doa dan harapan terbaik selalu menyertai kalian. Semoga persahabatan kita terjalin selamanya.
7. Ardiansyah, M.Si selaku Laboran Kultur Jaringan Tumbuhan, terima kasih atas bimbingan dan arahannya selama proses penelitian.
8. Kepada Family Imari/Baru terkhusus kedua orang tua, om dan tante (Darna, Iskandar, Tahir, Pani, Lina, Inna), persepupuan (Neli, Indah, Chairil, Imma, Cahaya, Baddi, Saha, Ipul) dan adik-adikku (Wandi, Hendra, Reski, Kamil, Ica, Aswar, Shanum). Terima kasih karna telah menjadi rumah tempat kembali yang banyak memberikan nasihat, dukungan dan sumber kebahagiaan serta motivasi bagi penulis dalam melanjutkan dan menyelesaikan pendidikan.
9. Sahabatku evil squad7, *My roommate* Diana Hachimi S.M, Amalia Rahma, S.M, Putri Paradillah, Nurfadillah R, Nurhalima dan Lilis Suryani, terimakasih telah menjadi bagian tak terpisahkan dari perjalanan hebat penulis. Terima kasih karna selalu bersedia mendengar keluh kesah, setia menemani, menghibur dan berbagi banyak hal kepada penulis. Terima kasih atas kehadiran setia dan telah bertahan sejauh ini. Semoga persahabatan kita tetap terjaga selamanya.
10. Sobat KKN Cappgal terkhusus kepada Saudari Dinda Amalia dan Ummul Khair Said, S.K.G yang telah memberikan warna baru dalam kehidupan perkuliahan. Terima kasih karna selalu mendukung, mejadi tempat cerita dan berbagi setiap momen indah bersama penulis. Terima kasih juga kepada Afifa Ghaliyah dan Yoseph Dian Eka Putra yang tetap kebersamai penulis hingga saat ini.
11. Ibu Marwati, Bapak Kardin, Rafli, tante Ani sekeluarga, terima kasih telah menjadi orangtua kedua Penulis selama di Makassar. Terima kasih juga kepada praktikan terbaikku Rara Putri Aulia yang selalu mendukung penulis.
12. Angkatan Covid 2020 (Biotropic) terkhusus kepada Ainun Amini, Riska, Hayatul Azizah dan Fatimah Az-Zahra. Tetap tangguh, loyal, inspiratif.
13. Keluarga Expost (MIPA 3) terkhusus kepada saudara Muh. Irsyad, Muh.Asri, Muh. Iqram Syarif, Widi Khrisnapati dan Rahul. Terima kasih karna tetap kebersamai penulis dari masa SMA hingga saat ini.

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya untuk semua pihak yang terlibat dalam proses penyusunan skripsi ini. Semoga bantuan tulus yang telah diberikan mendapat imbalan yang berlipat ganda dari Allah SWT, semoga di masa yang akan datang skripsi ini bisa berguna dan bermanfaat bagi banyak orang dan terutama bagi penulis, *Aamiin Allahumma Aamiin*.

Penulis,

Hasnawati

ABSTRAK

HASNAWATI Pengaruh penambahan elisitor kitosan dalam mengurangi kontaminasi mikroba pada kultur kalus kopi arabika *Coffea arabica* L. secara *in vitro* (Dibimbing oleh Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si dan Prof. Dr. Fahrudin, M.Si)

Latar Belakang. Kontaminasi merupakan masalah paling serius dalam kultur *in vitro* sehingga diperlukan elisitor yang bertindak sebagai agen antimikroba salah satunya adalah kitosan. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh elisitor kitosan dalam mengurangi kontaminasi mikroba pada kultur kalus kopi arabika *Coffea arabica* L. dan menganalisis konsentrasi optimal kitosan dalam mengurangi kontaminasi mikroba. **Metode.** Metode penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan kitosan pada taraf konsentrasi yaitu 0 ppm (kontrol), 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm yang ditambahkan pada media *Murashige-Skoog* (MS) + zat pengatur tumbuh 2,0 mg/L 2,4 D dan 0,5 mg/L kinetin dengan total perlakuan 5 kali ulangan. **Hasil.** Analisis data menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* memberikan pengaruh nyata terhadap eksplan hidup yang tidak terkontaminasi, dengan nilai persentase pada perlakuan kitosan 0 ppm (kontrol) dan kitosan 5 ppm sebesar 0%, kitosan 10 ppm sebesar 40%, kitosan 15 ppm sebesar 60%, kitosan 20 ppm sebesar 80%, kitosan 25 ppm sebesar 100%. Morfologi kalus bervariasi dengan tekstur remah dan kompak serta berwarna putih kekuningan hingga coklat dari pada berbagai perlakuan dengan penambahan kitosan. **Kesimpulan.** Temuan menunjukkan bahwa konsentrasi kitosan 25 ppm merupakan konsentrasi optimal dalam mengurangi kontaminasi mikroba pada kultur kalus kopi arabika *Coffea arabica* L. dengan persentase sebesar 100%.

Kata kunci: *kopi arabika; kultur kalus; kontaminasi; elisitor; kitosan*

ABSTRACT

HASNAWATI Effect of chitosan elicitor addition in reducing microbial contamination in arabica coffee callus culture *Coffea arabica* L. in vitro (Supervised by Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si and Prof. Dr. Fahrudin, M.Si)

Background. Contamination is the most serious problem in in vitro culture so that elicitors that act as antimicrobial agents are needed, one of which is chitosan. **Aim.** This study aims to examine the effect of chitosan elicitor in reducing microbial contamination in callus culture of *Coffea arabica* L. and analyze the optimal concentration of chitosan in inhibiting microbial contamination. **Methods.** The research method used was a complete randomized design (CRD) using chitosan at the concentration levels of 0 ppm (control), 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm and 25 ppm added to Murashige-Skoog (MS) media + growth regulators 2.0 mg/L 2,4 D and 0.5 mg/L kinetin with a total of 5 replications. **Results.** Data analysis using the Kruskal-Wallis nonparametric test gave a significant effect on uncontaminated live explants, with a percentage value in the treatment of 0 ppm chitosan (control) and 5 ppm chitosan at 0%, 10 ppm chitosan at 40%, 15 ppm chitosan at 60%, 20 ppm chitosan at 80%, 25 ppm chitosan at 100%. Callus morphology varies with crumbly and compact texture and yellowish white to brown color from various treatments with the addition of chitosan. **Conclusion.** The findings show that chitosan concentration of 25 ppm is the optimal concentration in reducing microbial contamination in callus culture of *Coffea arabica* L. with a percentage of 100%.

Keywords: *arabica coffee; callus culture; contamination; elicitor; chitosan*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Teori.....	2
1.2.1 Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	2
1.2.2 Teknik Kultur Jaringan.....	3
1.2.3 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)	4
1.2.4 Sterilisasi.....	5
1.2.5 Kitosan	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
BAB II METODE PENELITIAN	8
2.1 Waktu dan Lokasi Penelitian	8
2.2 Alat dan Bahan	8
2.3 Prosedur Kerja.....	8
2.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	8
2.3.2 Sterilisasi Eksplan	9
2.3.3 Pembuatan Larutan Stok Kitosan	9
2.3.4 Pembuatan Larutan Stok 2,4 D.....	9
2.3.5 Pembuatan Larutan Stok Kinetin	9
2.3.6 Pembuatan Larutan Media Pertumbuhan.....	10

2.3.7 Inisiasi Eksplan.....	10
2.4 Parameter Pengamatan.....	10
2.4.1 Persentase Eksplan Membentuk Kalus.....	10
2.4.2 Morfologi Kalus	11
2.4.3 Uji Elisitor Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi Mikroba.....	11
2.5 Analisis Data.....	11
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	12
3.1 Hasil Persentase Eksplan Membentuk Kalus.....	12
3.2 Morfologi Kalus.....	13
3.2.1 Tekstur Kalus.....	13
3.2.2 Warna Kalus.....	15
3.3 Hasil Uji Elisitor Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi Mikroba.....	16
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN.....	20
4.1 Kesimpulan.....	20
4.2 Saran.....	20
DAFTAR PUSTAKA.....	21
LAMPIRAN.....	24

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Kitosan	8
Tabel 2. Tekstur Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	14
Tabel 3. Warna Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L	15
Tabel 4. Hasil Uji Lanjut <i>Mann Whitney</i> Pada Taraf 5%.....	17
Tabel 5. Komposisi Media MS	24
Tabel 6. Data Hasil Pengamatan Persentase Kalus	33
Tabel 7. Data Hasil Pengamatan Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi	33
Tabel 8. Hasil Uji Normalitas Eksplan Membentuk Kalus	34
Tabel 9. Hasil Uji Normalitas Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi	34
Tabel 10. Hasil Uji Homogenitas Eksplan Membentuk Kalus.....	35
Tabel 11. Hasil Uji Homogenitas Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi	35
Tabel 12. Hasil Uji <i>Kruskal-Wallis</i> Eksplan Membentuk Kalus	36
Tabel 13. Hasil Uji <i>Kruskal-Wallis</i> Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi.....	36
Tabel 14. Hasil Perhitungan Uji Lanjut <i>Mann Whitney</i>	37

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Morfologi Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	2
Gambar 2. Rata-Rata Eksplan Membentuk Kalus	12
Gambar 3. Pembentukan Kalus Pada Eksplan	13
Gambar 4. Tekstur Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i>	14
Gambar 5. Persentase Ekplan Hidup Tidak Terkontaminasi	17
Gambar 6. Pengaruh Kitosan Sebagai Antibakteri	18
Gambar 7. Diagram Konseptual Kitosan Sebagai Antijamur	19
Gambar 8. Bagan Kerja Penelitian	26
Gambar 9. Sterilisasi Alat dan Ruang Kerja	27
Gambar 10. Pembuatan Larutan Stok ZPT	27
Gambar 11. Pembuatan Media Pertumbuhan	28
Gambar 12. Sterilisasi Eksplan Daun Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	29
Gambar 13. Inisiasi Eksplan Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	30
Gambar 14. Pengamatan dan Pemeliharaan Kultur Kalus	30
Gambar 15. Hasil Pengamatan Kalus Kopi Arabika <i>Coffea arabica</i> L.	31

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kopi merupakan salah satu komoditas unggulan perkebunan yang paling banyak diperdagangkan di dunia. *International Coffee Organization* pada tahun 2020 mencatat produksi kopi dunia telah mencapai hingga 10.2 juta ton (Velásquez dan Banchón, 2022). Meningkatnya kebutuhan konsumsi dan permintaan kopi di dunia mendorong Indonesia untuk meningkatkan hasil produksi tanaman kopi yang unggul. Salah satu metode paling sederhana dalam proses perbanyak tanaman yaitu melalui kultur jaringan atau kultur *in vitro*. Teknik ini didasarkan atas sifat *totipotensi* sel sehingga diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap peningkatan produksi kopi (Rismayanti dan Hanny., 2021).

Usaha perbanyak kopi arabika *Coffea arabica* L. menggunakan teknik kultur jaringan telah lama dilakukan, namun sampai saat ini masih menghadapi berbagai kendala salah satunya adalah kontaminasi. Faktor utama penyebab kontaminasi adalah mikroba yang masuk kedalam media atau eksplan. Hal ini dikarenakan media tumbuh dan eksplan merupakan substrat yang baik bagi pertumbuhan mikroorganisme termasuk bakteri dan jamur. Berbagai upaya telah dilakukan dalam meminimalisir kontaminasi yaitu melalui sterilisasi. Penggunaan bahan kimia juga seringkali digunakan dalam menekan pertumbuhan mikroba. Akan tetapi senyawa kimia yang terkandung seringkali merugikan eksplan yang dikultur. Oleh karena itu, pada media diperlukan elisitor yang mampu menekan pertumbuhan mikroba tanpa menghambat pertumbuhan dan diferensiasi eksplan.

Salah satu elisitor yang dapat digunakan adalah kitosan. Kitosan merupakan salah satu jenis elisitor biotik yang berasal dari kulit crustaceae. Kitosan memperoleh banyak perhatian di bidang pertanian karena bentuk dan sifatnya yang khas dalam menghambat pertumbuhan cendawan patogen dan kemampuannya sebagai ketahanan tanaman serta pemacu pertumbuhan. Menurut Damayanti dkk (2016), bahwa kitosan memiliki sifat antimikroba, karena dapat menghambat bakteri patogen dan mikroorganisme pembusuk termasuk jamur, bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Secara biologi, kitosan aman karena memiliki sifat *biokompatibel*, *biodegradable*, dan *non-toksik* sehingga aman diaplikasikan.

Berdasarkan hasil penelitian kalsum dkk (2018) bahwa kitosan dengan konsentrasi 25 ppm mampu memperpanjang umur simpan buah akibat kerusakan dari mikroba patogen. Untuk kultur tanaman *in vitro*, kitosan juga telah diterapkan pada kultur jaringan tanaman untuk memperbaiki beberapa parameter pertumbuhan dan akumulasi metabolit sekunder. Namun, informasi mengenai pengaruh kitosan sebagai antimikroba masih terbatas pada kultur kalus tanaman kopi. Oleh karena itu, penelitian terkait "Pengaruh Penambahan Elisitor Kitosan Dalam Mengurangi Kontaminasi Mikroba Pada Kultur Kalus Kopi Arabika *Coffea arabica* L. Secara *In Vitro*" penting untuk dilakukan sebagai dasar informasi untuk peningkatan produksi kopi dalam skala yang lebih besar.

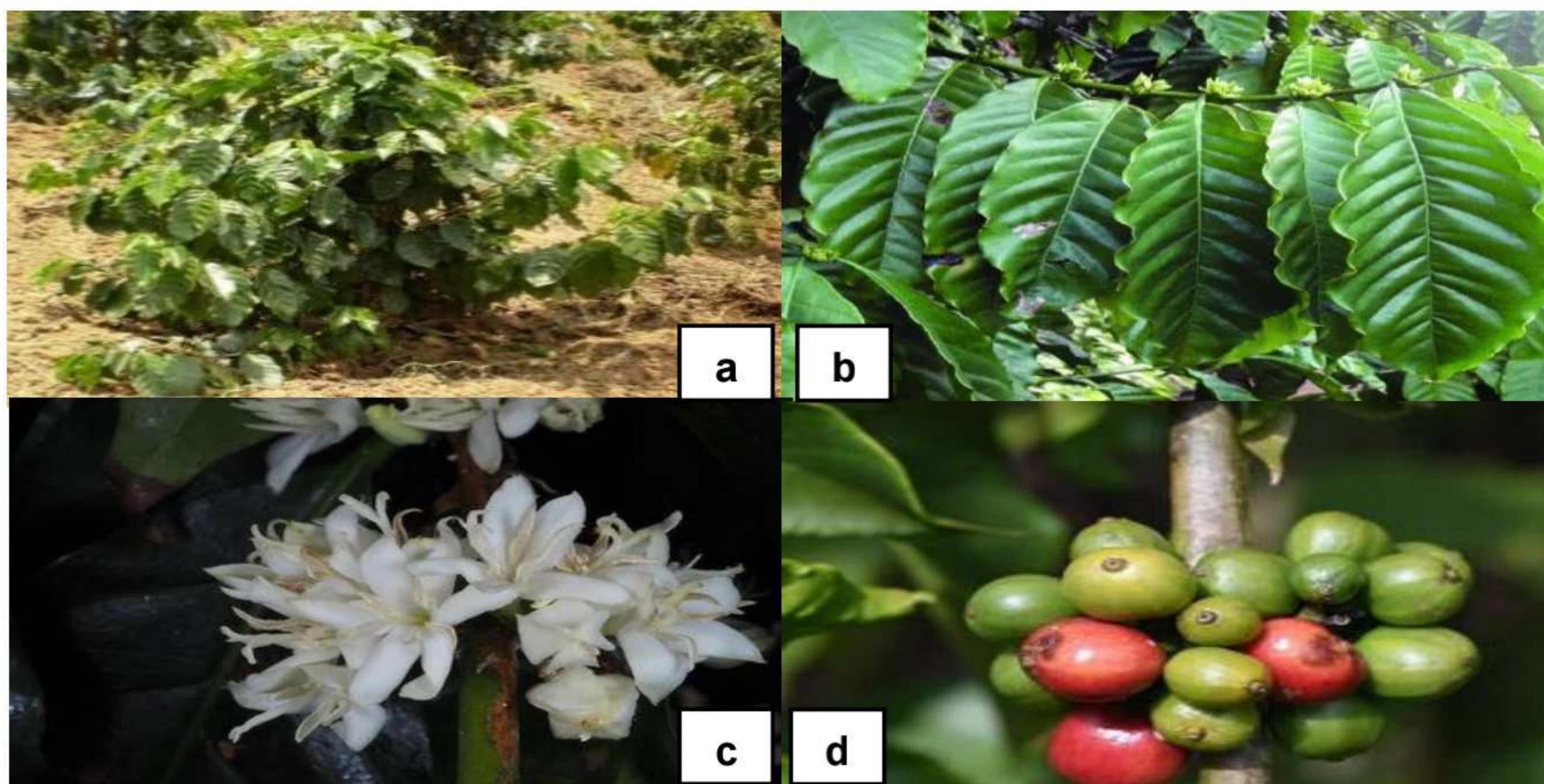
1.2 Teori

1.2.1 Kopi Arabika *Coffea arabica* L.

Kopi arabika *Coffea arabica* L. merupakan salah satu jenis kopi yang banyak dibudidayakan secara komersial oleh masyarakat. Kopi arabika *Coffea arabica* L, berasal dari Ethiopia dan Abessinia. Kopi ini berhasil menguasai pasar kopi di dunia hingga 70%. Kopi arabika *Coffea arabica* L. memiliki rasa yang lebih disukai oleh konsumen dibandingkan dengan jenis kopi lainnya. Mutu cita rasa ini menyebabkan nilai atau harga kopi arabika di pasaran tinggi (fitriyah, dkk., 2021).

Adapun klasifikasi kopi arabika *Coffea arabica* L. adalah sebagai berikut: (Tjitrosoepomo, 2013)

Regnum	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Subdivisio	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledoneae
Ordo	: Rubiales
Familia	: Rubiaceae
Genus	: <i>Coffea</i>
Species	: <i>Coffea arabica</i> L.



Gambar 1. Morfologi kopi arabika *Coffea arabica* L. (a) pohon. (b) daun. (c) bunga. (d) buah (*Plants of the world*, 2021)

Kopi arabika *Coffea arabica* L. dapat tumbuh pada ketinggian 1000-2000 mdpl, curah hujan 1.250-2.500 mm/tahun dengan temperatur 15-25°C, serta berbuah setahun sekali. Karakteristik fisik dari tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L. yakni tinggi pohon mencapai 3 meter, cabang primernya rata-rata mencapai 123 cm, sedangkan ruas cabangnya pendek. Batangnya tegak, bulat, percabangan monopodial, permukaan batang kasar, dan warna batangnya kuning keabu-abuan. Kopi arabika memiliki kelemahan yaitu, rentan terhadap penyakit karat daun oleh

jamur *Hemilica vastatrix* (Siswanto dan Ratnaningsih, 2022). Kopi arabika *Coffea arabica* L. cenderung menimbulkan aroma *fruity* karena adanya senyawa aldehid, asetaldehida, dan propanal. Kopi arabika *Coffea arabica* L. memiliki kadar kafein biji mentah yang lebih rendah dibandingkan biji mentah kopi robusta *Coffea canephora* L. dimana kandungan kafeinnya hanya sekitar 1.2%. Buah dari kopi ini berbentuk bulat seperti telur, dengan warna buah hijau kemudian berubah menjadi merah terang saat matang. Apabila buah kopi ini telah matang, maka cenderung mudah rontok (Siswanto dan Yulia, 2022).

1.2.2 Teknik Kultur Jaringan

Kultur jaringan atau dikenal juga dengan *tissue culture* adalah suatu teknik mengisolasi bagian-bagian dari tanaman seperti sel, jaringan, organ, protoplasma dan sebagainya yang ditumbuhkan secara khusus dalam suatu lingkungan yang aseptik (bebas mikroorganisme) untuk diperbanyak dan kemudian diregenerasikan kembali menjadi tanaman lengkap yang memiliki sifat yang sama dengan induknya. Teknik ini merupakan perbanyakan yang hanya memerlukan sebagian kecil dari tanaman yang digunakan untuk memperoleh bibit yang banyak serta bebas penyakit. Prinsip yang digunakan pada teknik kultur jaringan adalah *totipotensi* yang menyatakan bahwa setiap bagian tanaman dapat berkembang biak karena seluruh bagian dari tanaman tersebut terdiri atas jaringan-jaringan hidup yang mempunyai informasi genetik dan perangkat fisiologis yang lengkap untuk tumbuh dan berkembang menjadi tanaman lengkap kembali jika ditempatkan pada kondisi yang sesuai (Ziraluo, 2021).

Dalam melakukan kultur jaringan ada beberapa faktor yang mempengaruhi tingkat keberhasilan diantaranya yaitu, eksplan, media yang digunakan, dan lingkungan. Eksplan yang akan digunakan harus memenuhi beberapa syarat seperti, ukuran eksplan yang paling baik digunakan yaitu 0.5 sampai 1 cm, kemudian umur eksplan, dan genotipe eksplan. Adapun media yang digunakan dipengaruhi oleh kandungan yang terdapat didalamnya. Sementara itu, faktor lingkungan dipengaruhi oleh cahaya, suhu, pH, kelembaban, dan wadah yang digunakan sebagai media pertumbuhan, komposisi medium standar telah diformulasikan untuk mengoptimalkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Salah satu medium yang sering digunakan adalah Murashige dan Skoog (MS). Medium Murashige dan Skoog secara umum mengandung makronutrien dan mikronutrien berupa garam organik dalam kadar dan perbandingan tertentu, sumber karbohidrat, air, asam amino, vitamin, dan zat pengatur tumbuh (Apriliyana dan Baiq, 2021).

Eksplan yang dikultur akan beregenerasi membentuk kalus. Kalus merupakan kumpulan massa sel yang belum terorganisasi (*amorphous*) dan belum berdiferensiasi yang terbentuk ketika sel tanaman mengalami pembelahan yang tidak teratur, sebagai akibat dari perlukaan pada permukaan eksplan dan pengaruh perlakuan zat pengatur tumbuh pada media kultur (Setiawati, dkk., 2019). Kalus merupakan sumber yang sangat penting dalam meregenerasi tanaman karena setiap selnya mampu membentuk individu baru. Oleh karena itu, strategi kultur jaringan

melalui induksi kalus sangat efektif karena pembentukannya dapat diinisiasi dari bagian tanaman manapun (Rasud dan Bustaman, 2020).

Proses pembentukan kalus pada kultur *in vitro* dipengaruhi oleh genotipe, inisiasi kultur, lingkungan tumbuh dan fisiologi jaringan yang digunakan. Perbedaan yang terjadi akan lebih besar apabila eksplan tersusun lebih dari satu jenis sel (Rismayanti dan Hanny, 2021). Kalus dapat muncul bergerombol pada salah satu atau seluruh irisan eksplan. Pada awalnya kalus yang muncul pada bekas potongan eksplan bersifat remah, selanjutnya ketika sel terus berproliferasi maka lama-kelamaan kalus menjadi kompak dan berwarna putih. Kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Sehingga melalui penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT) terutama sitokinin dan stimulus cahaya proplastid yang terdapat dalam jaringan parenkim tersebut berdiferensiasi menjadi plastid yang mengandung klorofil, sehingga lama kelamaan kalus akan berubah menjadi warna hijau. Rasio sitokinin dan auksin menentukan morfogenesis pada kultur kalus (Faramayuda, dkk., 2016).

Tahap akhir dari rangkaian kultur jaringan yaitu aklimatisasi, planlet yang dihasilkan dari proses *in vitro* harus ditumbuhkan dalam lingkungan yang alami. Kondisi lingkungan mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Kondisi alami (aklimatisasi) memiliki kondisi yang lebih ekstrim dari kondisi sebelum dilakukan aklimatisasi. Dalam aklimatisasi diperlukan adanya modifikasi kondisi lingkungan terutama yang berkaitan dengan kelembaban, suhu, dan intensitas cahaya. Selain itu, media yang digunakan akan mempengaruhi pertumbuhan akar dari tanaman itu sendiri. Media sebagai pengantar atau penyedia unsur hara sehingga tanaman dapat bertahan hidup (Apriliyana dan Baiq, 2021).

1.2.3 Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Dalam teknik kultur jaringan terdapat beberapa faktor penentu salah satunya yakni media pertumbuhan. Media pertumbuhan adalah komposisi unsur hara makro, unsur hara mikro, sumber besi, sumber karbon, vitamin, dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Salah satu reaksi kimia yang cukup memegang peranan penting adalah hormon dan ZPT. Di dalam kultur jaringan, kehadiran ZPT sangat nyata pengaruhnya. Zat pengatur tumbuh berfungsi merangsang pertumbuhan tanaman, misalnya pertumbuhan akar, tunas, perkecambahan dan sebagainya (Riono, 2019).

Zat pengatur tumbuh yang biasa digunakan dalam kultur jaringan dapat berasal dari golongan auksin maupun sitokinin. Golongan Auksin terdiri atas IAA (*Indole Acetic Acid*), 2,4-D (*2,4-DichlorophenoxyAcetic Acid*), IBA (*Indole Butyric Acid*) dan NAA (*Naphtalen Acetic Acid*), sedangkan dari golongan sitokinin terdiri atas Kinetin, Zeatin dan BAP. Auksin umumnya berfungsi terhadap pemanjangan sel, pembentukan kalus dan akar adventif serta menghambat pembentukan tunas aksilar. Fungsi sitokinin adalah pembelahan sel, pembesaran sel, menghambat penuaan bunga dan buah, dan deferensiasi akar dan tunas (Budi, 2020).

Salah satu ZPT golongan auksin yang sering digunakan untuk menginduksi kalus adalah Asam 2.4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D). Jika dibandingkan dengan jenis

auksin lainnya, 2,4-D secara efektif dapat merangsang pembentukan kalus karena aktivitas yang kuat untuk memacu proses diferensiasi sel, organogenesis dan menjaga pertumbuhan kalus (Setiawati, dkk, 2019). Zat pengatur tumbuh yang tergolong dalam kelompok sitokinin yakni kinetin (*6-fifury amino purine*). Kinetin berfungsi untuk mengatur pembelahan sel dan morfogenesis. Dalam pertumbuhan jaringan tanaman, sitokinin bersama-sama dengan auksin memberikan pengaruh interaksi terhadap deferensiasi jaringan (Riono, 2019).

Dalam menginduksi kalus penambahan auksin sering dikombinasikan dengan sitokinin. Penambahan auksin atau sitokinin ke dalam media kultur dapat meningkatkan konsentrasi ZPT endogen di dalam sel, sehingga menjadi factor pemicu dalam proses pertumbuhan dan perkembangan jaringan. Kombinasi antara auksin dan sitokinin dapat menunjukkan hasil morfologi dan tekstur kalus yang berbeda setelah dua minggu masa tanam. Pemberian kombinasi zat pengatur tumbuh (ZPT) asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan kinetin pada media MS berhasil menginduksi pembentukan kalus dari eksplan (Setiawati, dkk., 2019).

Pemberian zat pengatur tumbuh pula dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder, hal ini disebabkan zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dapat menyebabkan perubahan fisiologi dan biokimia tumbuhan melalui pengaturan kerja enzim. ZPT akan menginduksi sintesis enzim yang ekspresinya tergantung sintesis RNA dan protein. Peningkatan jumlah enzim yang terlibat dalam metabolit sekunder juga akan meningkatkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan (Faramayuda, dkk., 2016).

1.2.4 Sterilisasi

Sterilisasi merupakan suatu usaha yang dilakukan untuk mencegah terjadinya kontaminasi baik yang disebabkan oleh jamur, bakteri, maupun virus. Pada kultur jaringan, biasanya dilakukan sterilisasi peralatan kultur jaringan, media kultur, dan bahan tanam yang digunakan (Wulandari, dkk.. 2021). Berbagai bahan kimia seperti etanol, air brom (BW), hidrogen peroksida (H₂O₂), merkuri klorida (HgCl), natrium hipoklorit (NaOCl), kalsium hipoklorit (CaOCl), perak nitrat (AgNO), fungisida, serta agen anti infeksi seringkali digunakan dalam proses sterilisasi permukaan bahan tanam untuk menunjang keberhasilan dalam memperbanyak tanaman melalui kultur jaringan (Withana, dkk., 2022).

Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri dan jamur merupakan masalah yang sering menyerang kultur jaringan tanaman. Kontaminasi dapat diartikan sebagai kondisi lingkungan kultur yang terganggu akibat adanya kontaminan yang masuk baik pada media maupun eksplan (Heriansyah dan Elfi, 2020). Sumber kontaminasi dapat berasal dari peralatan yang terbuat dari kaca maupun plastik. media kultur, peralatan yang digunakan untuk memindahkan eksplan ke media bahan tanam yang dipakai, serta ruang penanaman dan pertumbuhan eksplan. Persiapan dan pemeliharaan sistem kultur jaringan memerlukan sterilisasi media kultur, wadah kultur, dan sterilisasi permukaan benih atau jaringan tanaman yang

dikultur, serta sterilisasi semua peralatan yang digunakan untuk kegiatan kultur jaringan agar dapat terhindar dari kontaminasi (Wulandari, dkk, 2021).

Sterilisasi ruang kerja juga perlu dilakukan dengan cara mengaplikasikannya pada ruang laboratorium khususnya ruang tanam dan ruang inkubasi pertumbuhan. Untuk sterilisasi alat dilakukan dengan panas-basah menggunakan autoklaf atau panas-kering dengan menggunakan oven. Alat-alat yang perlu disterilkan adalah alat-alat yang digunakan sebagai tempat medium tumbuh dan alat-alat menanam. Sterilisasi eksplan berprinsip mematikan mikroorganisme tanpa mematikan jaringan eksplan tersebut. Sterilisasi eksplan dapat dilakukan dengan beberapa cara diantaranya dengan menggunakan etanol sebagai bahan perendam serta dapat dilakukan dengan perendaman natrium klorat dan pencucian dengan kalsium hipoklorit karbonat (Apriliyana dan Baiq, 2021).

1.2.5 Kitosan

Kitosan adalah modifikasi dari senyawa polimer karbohidrat yang berasal kitin yang banyak terdapat dalam kulit luar hewan *Crustacea* seperti udang dan kepiting. Kitosan merupakan hasil dari deasetilasi kitin melalui reaksi kimia dengan menggunakan enzim kitin deasetilase dan basa kuat. Unit penyusun kitosan merupakan poli (2-amino-2-deoksi- β -D-glukosa) yang terdiri atas satuan-satuan glukosamin yang terpolimerisasi oleh rantai β -1,4-glikosidik. Seperti halnya polisakarida yang lain, kitosan memiliki kerangka gula, tetapi dengan sifat yang unik karena polimer ini memiliki gugus amina bermuatan positif. Kitosan merupakan suatu polimer yang bersifat polikationik dengan berat molekul antara 300 hingga 1000 kDa tergantung sumber kitinnya, kopolimer berbentuk lembaran tipis, berwarna putih atau kuning, serta tidak berbau. Keberadaan gugus hidroksil dan amino berada disepanjang rantai polimer (Hasanela, dkk., 2020).

Kitosan merupakan biopolymer alami terbanyak kedua setelah selulosa, yang terdapat di alam dan telah banyak diaplikasikan dalam berbagai bidang seperti bidang farmasi, pangan, mikrobiologi, pertanian, kesehatan, kosmetika dan lain-lain (Kurniasih, dkk., 2018; Yanti, dkk., 2018; Jayanudin dan Lestari, 2020). Secara biologi, kitosan aman karena memiliki sifat *biokompatibel*, *biodegradable*, dan *non-toksik* sehingga aman digunakan diaplikasikan dalam industri dan ramah lingkungan. Kitosan memperoleh banyak perhatian di bidang pertanian karena bentuk dan sifatnya yang khas dalam menghambat pertumbuhan banyak cendawan patogen dan kemampuannya sebagai ketahanan tanaman.

Kitosan merupakan senyawa serbaguna dengan aktivitas antimikroba utamanya sebagai fungisida alami. Kitosan mempengaruhi perkecambahan dan hifa morfologi patogen jamur pasca panen yang penting secara ekonomi (misalnya *Rhizopus stolonifer* dan *Botrytis cinerea*). Beberapa hasil penelitian menunjukkan aktivitas antimikroba kitosan melalui penggunaan kitosan sebagai pelapis (*coating*) pada buah apel, kiwi, pir, stroberi, dan raspberry mampu mengendalikan busuk pascapanen pada saat penyimpanan (Nurafida, dkk., 2017). Selain itu, penyakit busuk buah kakao, kerdil hampa pada padi, busuk akar *Fusarium* pada tomat dan

antraknosa buah pepaya juga dapat dikendalikan dengan kitosan. Selain itu, beberapa penelitian menunjukkan bahwa kitosan dapat menghambat perkecambahan spora cendawan patogen penyebab kapang biru pada buah tomat, *Penicillium expansum* dan *Botrytis cinerea* secara signifikan.

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengkaji pengaruh elisitor kitosan dalam mengurangi kontaminasi mikroba pada kultur kalus kopi arabika *Coffea arabica* L.
2. Untuk menganalisis konsentrasi optimal elisitor kitosan dalam mengurangi kontaminasi mikroba pada kultur kalus kopi arabika *Coffea arabica* L.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh penambahan elisitor kitosan dalam media dalam mengurangi kontaminasi pada kultur kalus tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L. secara *in vitro*. Selain itu, melalui penelitian ini dapat menjadi salah satu cara untuk mengetahui konsentrasi optimal kitosan terhadap pertumbuhan kultur kalus kopi arabika *Coffea arabica* L. untuk meningkatkan produksi kopi dengan memanfaatkan teknologi kultur jaringan.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2023 hingga Maret 2024, di Laboratorium Kultur Jaringan Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan saat penelitian ini dilakukan yaitu: gelas beaker, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, botol kultur, pipet tetes, pH meter, batang pengaduk, spatula, timbangan analitik, autoklaf, *Laminar Air Flow* (LAF), *hot plate*, kompor, bunsen, rak kultur, pinset, scalpel, gunting, kulkas, ATK, spoit, dan kamera. Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini diantaranya: media pertumbuhan *Murashige-Skoog* (MS), agar, eksplan tanaman kopi arabika *Coffea arabica* L., zat pengatur tumbuh kinetin dan 2,4-D, alkohol 70%, larutan Natrium Hipoklorit (NaOCl) 1%, kitosan, KOH, HCl, fungisida mancozeb, akuades, detergen, spiritus, tisu, kertas label, *plastic seal*, *cling wrap*, korek api, karet gelang, dan *aluminium foil*.

2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan metode rancangan acak lengkap (RAL) menggunakan kitosan pada berbagai taraf konsentrasi yaitu 0, 5, 10, 15, 20 dan 25 (ppm) sebanyak 5 kali ulangan, sehingga diperoleh total data percobaan sebanyak 30 data.

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan Kitosan Pada Media MS + ZPT

Media	Konsentrasi kitosan (ppm)					
	0	5	10	15	20	25
Media MS + ZPT	M ₁ K ₀	M ₁ K ₁	M ₁ K ₂	M ₁ K ₃	M ₁ K ₄	M ₁ K ₅
	M ₂ K ₀	M ₂ K ₁	M ₂ K ₂	M ₂ K ₃	M ₂ K ₄	M ₂ K ₅
	M ₃ K ₀	M ₃ K ₁	M ₃ K ₂	M ₃ K ₃	M ₃ K ₄	M ₃ K ₅
	M ₄ K ₀	M ₄ K ₁	M ₄ K ₂	M ₄ K ₃	M ₄ K ₄	M ₄ K ₅
	M ₅ K ₀	M ₅ K ₁	M ₅ K ₂	M ₅ K ₃	M ₅ K ₄	M ₅ K ₅

Keterangan: K: Kitosan, M: Media MS+ZPT

2.4 Prosedur Kerja

2.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian harus dalam keadaan steril. Sebelum disterilkan menggunakan autoklaf, alat gelas dan alat logam terlebih dahulu dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan air mengalir sampai bersih, kemudian

dibungkus dengan kertas. Untuk botol kultur dan aquadest steril, botol kultur kosong bersih dan botol kultur yang berisi akuades ditutup dengan aluminium foil. Alat-alat gelas dan alat-alat logam kemudian disterilkan dengan autoklaf selama 60 menit dan media pertumbuhan selama 15 menit dengan suhu 121 °C pada tekanan 2 atm. Alat penanaman setelah disterilkan kemudian di autoklaf. Sementara itu, alat berupa pinset, scalpel, dan gunting direndam dengan alkohol 96% lalu dipanaskan di atas nyala api bunsen dengan tujuan agar tetap steril saat penanaman berlangsung.

2.4.2 Sterilisasi Eksplan

Sampel daun cabang plagiotrop dipetik dan dibersihkan menggunakan air mengalir selama 15 sampai 20 menit. Daun dibilas dengan detergen secara perlahan dan dilanjutkan dengan perendaman fungisida berbahan dasar mankozeb dengan konsentrasi 0.2% selama 10 sampai 12 menit, lalu dibilas dengan air suling ganda. Setelah dibilas, daun kemudian disterilisasi menggunakan etanol 70% selama 6 sampai 7 menit dan dibilas dengan air suling. Setelah itu, daun ditambahkan larutan Natrium Hipoklorit (NaOCl) 1% selama 10 sampai 12 menit dan dibilas dengan air suling ganda steril sebanyak 5 kali

2.4.3 Pembuatan Larutan Stok Kitosan

Larutan kitosan dibuat dengan cara membuat larutan stok terlebih dahulu. Pembuatan larutan stok dengan melarutkan 100 mg kitosan instan dalam 1 mL HCL 1% kemudian ditambahkan hingga mencapai 1000 mL aquades. Larutan stok tersebut memiliki konsentrasi 100 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran dengan 100 ml aquades sesuai perlakuan. Konsentrasi yang dibuat antara lain (0, 5, 10, 15, 20 dan 25) ppm. Volume larutan stok yang digunakan pada setiap perlakuan antara lain 5 mL/100 mL (5 ppm). Pembuatan 5 ppm membutuhkan 5 mL larutan stok yang dilarutkan dengan aquades hingga 100 mL dan seterusnya sesuai perlakuan.

2.4.4 Pembuatan Larutan Stok 2,4-D

Pembuatan larutan stok 2,4-D diawali dengan penimbangan hormon 2,4-D bubuk sebanyak 0.1 gram. Hormon 2,4-D yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer kecil lalu dilarutkan dengan KOH. Selanjutnya ditambahkan akuades sebanyak 100 ml secara perlahan untuk mendapatkan larutan stok yang bening dengan cara diaduk secara terus-menerus. Kemudian larutan stok yang telah dibuat diberikan label dan dimasukkan ke dalam kulkas.

2.4.5 Pembuatan Larutan Stok Kinetin

Pembuatan larutan stok hormon kinetin diawali dengan penimbangan kinetin bubuk sebanyak 0,1 gram. Kinetin yang sudah ditimbang kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer kecil lalu dilarutkan dengan HCl. Selanjutnya ditambahkan

akuades sebanyak 100 ml secara perlahan untuk mendapatkan larutan stok yang bening dengan cara diaduk secara terus-menerus. Kemudian larutan stok yang telah dibuat diberikan label dan dimasukkan ke dalam kulkas.

2.4.6 Pembuatan Media Pertumbuhan

Pembuatan media pertumbuhan Murashige-Skoog (MS) dilakukan dengan cara media MS instan ditimbang sebanyak 4,43 gr/L, gula sebanyak 30 gr/L, dan agar sebanyak 7 gr/L lalu masing-masing dimasukkan ke dalam gelas beaker. Ditambahkan ZPT 2,4-D sebanyak 2,0 mg/L dan kinetin sebanyak 0,5 mg/L ke dalam gelas beaker lalu ditambahkan aquades steril hingga 1000 ml dan diaduk hingga rata. Selanjutnya diatur pH berkisar 5,6- 5,8 dengan penambahan HCl atau KOH. Sebanyak 7 g agar ditambahkan ke dalam campuran media sambil dipanaskan hingga larut atau berwarna transparan. Lalu sebanyak 25 mL media dituangkan pada botol kultur yang digunakan, lalu ditutup rapat dengan plastik *sea/* dan dimasukkan ke dalam *autoclave* pada tekanan 2 atm selama 15 menit pada suhu 121 °C. Selanjutnya media MS ditambahkan larutan kitosan dengan variasi konsentrasi kitosan (0, 5, 10, 15, 20 dan 25) ppm (dari stok kitosan konsentrasi 100 ppm pH 5,8). Sterilisasi media MS dan larutan stok kitosan dilakukan secara terpisah untuk mencegah terjadinya penggumpalan pada media kitosan. Media MS dan larutan stok kitosan steril dicampurkan dan dituang ke botol kultur secara aseptis didalam LAF.

2.4.7 Inisiasi Eksplan

Eksplan kopi arabika yang digunakan adalah daun urutan ke-2 atau ke-3 dari pucuk yang kemudian dicuci dengan air mengalir. Setelah itu, daun dicuci dengan sabun cair (*sunlight*) dan ditambahkan 2-3 tetes natrium hipoklorit. Eksplan dibilas di bawah air mengalir sampai tidak ada sisa sabun, lalu dibilas kembali menggunakan akuades steril dan diletakan pada cawan petri steril. Sterilisasi eksplan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow*. Kemudian direndam eksplan dalam alkohol 70% selama 3 menit. Eksplan dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Eksplan yang sudah steril diletakkan di atas kertas saring steril pada petridish kemudian dipotong sebesar 1 x 1 cm², lalu potongan eksplan diletakan pada media MS secara aseptis. Setelah itu, botol ditutup dengan plastik *sea/*. Kultur dipelihara di ruang inkubasi pada suhu 25 °C serta dilakukan pemeliharaan dengan menyemprot botol kultur secara berkala dengan menggunakan alkohol 70%.

2.5 Parameter Pengamatan

2.5.1 Persentase Eksplan Membentuk Kalus

Pertumbuhan kalus pada eksplan dinyatakan dalam persentase pertumbuhan dengan rumus :

$$\text{Persentase pertumbuhan} = \frac{\text{eksplan yang berhasil membentuk kalus}}{\text{total eksplan yang diinisiasi}} \times 100 \%$$

2.5.2. Morfologi Kalus

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan terhadap morfologi berupa tekstur dan warna kalus. Selain itu, morfologi kalus diamati untuk melihat agen kontaminan yang mungkin muncul pada kalus atau media pertumbuhan. Pengamatan dilakukan pada hari terakhir penelitian.

2.5.3 Uji Elisitor Kitosan dalam Mengurangi Kontaminasi Mikroba

Uji ini dilakukan dengan cara mengamati pertumbuhan kultur eksperimental secara langsung pada media pertumbuhan dengan konsentrasi kitosan yang berbeda-beda. Pengamatan yang dilakukan yakni pengamatan eksplan hidup yang tidak terkontaminasi pada kultur yang sudah ditanam. Kultur dan media yang terkontaminasi ditandai dengan adanya perubahan warna dan tekstur pada kalus dan media. Pengamatan presentase eksplan hidup yang tidak terkontaminasi dengan menghitung banyaknya eksplan hidup yang tidak terkontaminasi dibandingkan dengan total eksplan yang ditanam. Presentase eksplan hidup yang tidak terkontaminasi dilakukan di akhir pengamatan, dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan hidup} = \frac{\text{eksplan yang hidup tiap perlakuan}}{\text{total eksplan yang tiap perlakuan}} \times 100 \%$$

2.6 Analisis Data

Data yang diperoleh diolah dan dianalisis menggunakan uji statistik nonparametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan apabila terdapat perbedaan yang signifikan maka akan dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Mann-Whitney* pada taraf 5%.