

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.)

Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) merupakan spesies tumbuhan berbunga yang termasuk dalam famili Rubiaceae, genus *Coffea*, dan tergolong ke dalam ordo Gentianales. Genus *Coffea* sendiri tercatat memiliki lebih dari seratus spesies yang tersebar di wilayah tropis Afrika, Madagaskar, dan Asia, namun hanya *C. arabica* dan *C. canephora* yang memiliki nilai ekonomi penting dalam perdagangan kopi dunia (Davis et al., 2006). Secara taksonomis, *C. arabica* dibedakan dari kerabat dekatnya melalui karakter morfologi bunga, buah, serta jumlah kromosom, di mana *C. arabica* bersifat tetraploid ($2n = 4x = 44$), berbeda dari sebagian besar spesies *Coffea* lain yang diploid ($2n = 2x = 22$) (Davis et al., 2006).

Tanaman kopi Arabika tumbuh sebagai perdu atau pohon kecil dengan percabangan bertingkat (plagiotropik dan ortotropik) yang menghasilkan ruas-ruas batang (nodus) tempat tunas aksilar (*axillary bud*) berkembang. Tunas aksilar inilah yang lazim digunakan sebagai sumber eksplan dalam perbanyakan *in vitro* karena mengandung jaringan meristematik yang memiliki kapasitas regenerasi tinggi dan bersifat *totipoten*, yaitu kemampuan sel tunggal untuk berkembang menjadi individu tanaman utuh (Murashige & Skoog, 1962; George et al., 2008). Bagian tunas muda umumnya dipilih sebagai bahan eksplan karena jaringannya masih aktif membelah dan relatif lebih responsif terhadap induksi pertumbuhan *in vitro* dibandingkan jaringan dewasa yang telah mengalami lignifikasi.

Keunggulan dan Kendala Perbanyakan. Perbanyakan konvensional kopi Arabika, baik secara generatif melalui biji maupun vegetatif melalui stek dan sambung pucuk, menghadapi berbagai kendala teknis. Perbanyakan melalui biji memiliki kapasitas multiplikasi rendah serta memerlukan lahan pembibitan yang luas dan waktu yang panjang, sedangkan perbanyakan vegetatif konvensional bersifat padat karya dan berbiaya tinggi (Avila-Victor et al., 2023). Di sisi lain, kultur jaringan menawarkan keunggulan berupa kemampuan menghasilkan bibit

dalam jumlah besar secara seragam, bebas dari ketergantungan musim, serta mempertahankan sifat genetik unggul dari tanaman induk (George et al., 2008). Namun demikian, keunggulan tersebut hanya dapat diwujudkan apabila tahap inisiasi kultur berhasil dilalui tanpa gangguan kontaminasi mikroorganisme, yang justru menjadi kendala utama pada tanaman berkayu tahunan seperti kopi.

2.2 Teknik Kultur Jaringan dan Inisiasi Aseptik

Kultur jaringan tanaman (*plant tissue culture*) adalah teknik perbanyakan tanaman yang memanfaatkan prinsip totipotensi sel, yaitu kemampuan sel atau jaringan tanaman untuk beregenerasi menjadi tanaman lengkap apabila ditumbuhkan pada media buatan dengan komposisi nutrisi, vitamin, dan zat pengatur tumbuh yang sesuai dalam kondisi aseptik (Murashige & Skoog, 1962). Formulasi media dasar Murashige dan Skoog (MS) yang dikembangkan sejak tahun 1962 hingga kini masih menjadi acuan standar dalam berbagai penelitian kultur jaringan, termasuk pada tanaman kopi, karena kandungan hara makro dan mikronya yang mendukung pertumbuhan optimal berbagai jenis eksplan (Murashige & Skoog, 1962; George et al., 2008).

Mikropropagasi umumnya terdiri atas beberapa tahapan berurutan, yaitu (1) pemilihan dan persiapan bahan tanam, (2) inisiasi kultur (*establishment*), (3) multiplikasi tunas, (4) pengakaran, dan (5) aklimatisasi. Di antara tahapan tersebut, inisiasi kultur merupakan tahap paling kritis karena menentukan apakah eksplan dapat bertahan hidup dalam kondisi *in vitro* tanpa terkontaminasi oleh mikroorganisme yang dapat menghambat pertumbuhan bahkan mematikan eksplan (George et al., 2008). Kegagalan pada tahap inisiasi akan menggugurkan seluruh tahapan mikropropagasi berikutnya, sehingga efisiensi dan efektivitas protokol sterilisasi pada tahap ini sangat menentukan keberhasilan keseluruhan proses.

Mencapai kondisi aksenik (bebas mikroorganisme) pada eksplan bukanlah hal yang mudah, terutama pada tanaman yang diperbanyak dari bahan lapangan (*field-collected material*) seperti kopi. Kontaminasi pada tahap inisiasi dapat bersumber dari dua jalur utama, yaitu mikroorganisme yang terbawa pada permukaan atau di dalam jaringan eksplan itu sendiri, maupun kontaminasi yang

berasal dari prosedur kerja yang tidak steril di laboratorium (Cassells, 1991). Sifat ganda sumber kontaminasi inilah yang menjadikan proses sterilisasi eksplan sebagai tahapan yang kompleks dan memerlukan optimalisasi protokol secara spesifik untuk setiap jenis tanaman, termasuk kopi Arabika.

2.3 Bahan Sterilan Alkohol (Etanol) dalam Kultur Jaringan

Alkohol, khususnya etanol, merupakan senyawa organik golongan alkohol primer yang bersifat mudah menguap (volatil) dan larut sempurna dalam air, sifat yang menjadikannya banyak digunakan sebagai agen antiseptik dan desinfektan dalam berbagai bidang, termasuk kultur jaringan tanaman (McDonnell & Russell, 1999).

Secara mekanistik, etanol bekerja melalui dua jalur utama, yaitu mendenaturasi protein struktural dan enzimatis sel mikroorganisme sehingga mengganggu fungsi metabolismenya, serta melarutkan komponen lipid pada membran sel yang menyebabkan kebocoran isi sel dan kematian mikroorganisme (McDonnell & Russell, 1999). Efektivitas kerja etanol sangat bergantung pada keberadaan air dalam larutan, karena air berperan memfasilitasi proses denaturasi protein secara lebih menyeluruh oleh karena itu, etanol absolut (100%) justru kurang efektif dibandingkan larutan etanol dengan konsentrasi tertentu yang mengandung campuran air (McDonnell & Russell, 1999).

Meskipun alkohol dikenal sebagai agen sterilan yang kuat, penggunaannya pada eksplan tanaman memerlukan kehati-hatian karena konsentrasi yang terlalu tinggi maupun waktu kontak yang terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan sel-sel meristematik eksplan, memicu pencoklatan (*browning*) akibat oksidasi senyawa fenolik, hingga nekrosis jaringan (Singh, 2018). Dengan demikian, penentuan konsentrasi alkohol yang tepat merupakan titik keseimbangan (*trade-off*) antara efektivitas antimikroba dan keselamatan jaringan eksplan, yang nilainya dapat bervariasi tergantung jenis dan ketebalan jaringan tanaman yang disterilisasi.

2.4 Dinamika Kontaminasi Mikroorganisme pada Kultur In Vitro

Kontaminasi mikroorganisme merupakan kendala klasik dan paling sering dilaporkan dalam kultur jaringan tanaman. Berdasarkan asal-usulnya, kontaminan

dapat dikelompokkan menjadi dua kategori utama, yaitu kontaminan eksogen (epifit) yang menempel pada permukaan eksplan dan lingkungan kerja, serta kontaminan endogen (endofit) yang telah berkolonisasi di dalam jaringan tanaman sejak dari lapangan (Cassells, 1991). Kedua kategori kontaminan ini memiliki karakteristik dan tingkat kerentanan yang berbeda terhadap perlakuan sterilan permukaan, sebagaimana diuraikan pada subbab berikut.

2.4.1 Kontaminasi Jamur (Fungi)

Kontaminasi jamur pada kultur *in vitro* umumnya bersumber dari spora yang bersifat eksogen, yakni menempel pada permukaan eksplan melalui kontak dengan udara, air, tanah, atau peralatan kerja yang tidak steril (Cassells, 1991). Karena berada pada permukaan jaringan, kontaminan jamur relatif lebih mudah dijangkau dan dieliminasi melalui kontak langsung dengan larutan sterilan permukaan seperti alkohol, dibandingkan dengan kontaminan yang berada di dalam jaringan tanaman. Struktur dinding sel fungi yang tersusun atas kitin juga memberikan karakteristik resistensi yang berbeda terhadap denaturasi oleh alkohol dibandingkan struktur dinding sel bakteri (McDonnell & Russell, 1999). Secara umum, tingkat kerentanan jamur terhadap peningkatan konsentrasi sterilan permukaan bersifat progresif dan dapat diprediksi, sehingga kontaminasi jamur relatif lebih mudah dikendalikan melalui optimalisasi protokol sterilisasi permukaan.

2.4.2 Kontaminasi Bakteri Endofit Sistemik

Berbeda dengan kontaminan jamur, kontaminasi bakteri pada tanaman berkayu tahunan (*woody perennials*) seperti kopi sering kali bersifat endofit sistemik, yaitu telah berkolonisasi di dalam jaringan vaskular (xilem dan floem) atau ruang antarsel eksplan sejak fase pertumbuhan tanaman induk di lapangan (Leifert & Cassells, 2001). Studi lapangan pada tanaman *Coffea arabica* L. bahkan telah mengonfirmasi keberadaan beragam genus bakteri endofit yang secara alami menghuni jaringan internal tanaman kopi tanpa menimbulkan gejala penyakit yang tampak pada tanaman induknya (Vega et al., 2005). Kondisi laten inilah yang menjadikan bakteri endofit sulit terdeteksi sebelum eksplan diinokulasikan ke media kultur, dan gejala kontaminasinya baru muncul setelah

beberapa hari masa inkubasi ketika kondisi media kultur yang kaya nutrisi memicu proliferasi bakteri tersebut.

Lokasi kolonisasi yang berada di dalam jaringan vaskular menjadikan bakteri endofit sulit dieliminasi melalui sterilisasi permukaan konvensional, karena larutan sterilan seperti alkohol hanya bekerja secara topikal pada permukaan eksplan dan tidak mampu menembus jauh ke dalam jaringan internal tanpa merusak struktur sel itu sendiri (Leifert & Cassells, 2001; Orlikowska et al., 2017). Kesulitan membangun kultur aksenik dari eksplan kopi yang dikoleksi langsung dari lapangan bahkan telah dilaporkan sejak lama sebagai kendala klasik dalam mikropropagasi kopi dan kakao (Duhem et al., 1988), yang menegaskan bahwa masalah kontaminasi bakteri endofit pada tanaman kopi bukanlah temuan baru, melainkan tantangan yang terus dihadapi dalam pengembangan protokol sterilisasi hingga saat ini.