

## I. HASIL ANALISIS DAN PEMBAHASAN

Tahap awal kultur *in vitro* yang memiliki peranan penting dalam keberhasilan kultur adalah proses sterilisasi. Sterilisasi merupakan proses penghancuran atau pemusnahan terhadap semua kontaminan. Hal yang penting dari proses sterilisasi adalah mengkombinasikan antara usaha untuk mendapatkan eksplan yang steril dan menjaga agar jaringan eksplan tidak rusak akibat tingginya disinfektan (Pancaningtyas, 2011).

Menurut Anis *dkk* (2015), tahap sterilisasi pada eksplan tanaman yang akan digunakan dimulai dengan cara mencuci serta membuang bagian-bagian eksplan yang kotor dan sudah mati di bawah air bersih yang mengalir. Tahapan pencucian ini dapat dilakukan dengan cara menyikat eksplan menggunakan deterjen. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk memecah koloni kontaminan yang masih tertempel pada permukaan eksplan dan agar koloni tersebut lebih peka terhadap bahan-bahan sterilisasi. Selain itu tujuan dari pencucian serta penyikatan pada eksplan, yaitu untuk mengurangi dan menghilangkan senyawa fenol, terutama pada tanaman yang kandungan fenoliknya tinggi.

Perbanyakan tanaman dengan teknik kultur *in vitro* tidak terlepas dari kegagalan yang dapat diakibatkan oleh kontaminasi. Sumber kontaminasi dapat berasal dari tanaman baik internal maupun eksternal, media kultur yang tidak disterilkan dengan baik, kondisi lingkungan dan cara kerja sterilisasi yang salah

(Onwubiko *et al*, 2003). Pada penelitian kali ini tahapan sterilisasi dilakukan sebanyak 2 tahapan, hal ini dikarenakan pada tahap sterilisasi pertama eksplan tidak menunjukkan pertumbuhan yang baik. Sterilisasi tahap kedua dilakukan setelah pengamatan minggu ke-2 pada tahap sterilisasi pertama.

### A. Sterilisasi Tahap Pertama

Sterilisasi tahap pertama pada penelitian ini yaitu dilakukan dengan menggunakan deterjen sebanyak 2 gram selama 10 menit, bakterisida dan fungisida sebanyak 2 gram/L selama 60 serta menggunakan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sesuai dengan konsentrasi yaitu 1%, 2%, dan 3% selama 5 menit dan 10 menit. Sterilisasi pertama yang dilakukan pada penelitian ini tidak memberikan pengaruh yang terlalu besar pada eksplan yang ditanam. Hasil persentase dari pengamatan yang telah dilakukan, dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Sterilisasi terhadap Persentase Hidup, Persentase Kontaminasi, dan Persentase *Browning* Eksplan Embrio Biji Kepel selama 2 Minggu

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup	Persentase Eksplan Kontaminasi	Persentase Eksplan <i>Browning</i>	Jenis Kontaminasi	Saat Kontaminasi (HST)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1% - 5'	38,89%	11,11%	50%	Bakteri	14
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1% - 10'	38,88%	2,77%	36,11%	Bakteri	13
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2% - 5'	66,61%	5,50%	61,11%	Bakteri	13
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2% - 10'	25,01%	13,88%	61,11%	Bakteri	12
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% - 5'	13,89%	0%	86,11%	-	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% - 10'	13,89%	0%	86,11%	-	0

## 1. Persentase Kontaminasi (%)

Pengamatan eksplan terkontaminasi bertujuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan sterilisasi baik pada eksplan, alat maupun medium (Imanudin, 2016). Menurut Anis dkk (2015), tahapan sterilisasi akan menentukan keberhasilan pada proses perbanyakan tanaman melalui teknik kultur *in vitro*. Tujuan dari kegiatan sterilisasi eksplan yaitu untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada tahapan selanjutnya. Eksplan yang terkontaminasi akan berdampak pada saat proses pertumbuhan eksplan yang diharapkan tumbuh menjadi kalus. Menurut Rahmawati (2008), patogen dapat mempertahankan diri dalam bentuk miselium atau dalam bentuk lain di dalam embrio, endosperm, kulit atau permukaan eksplan. Pencegahan kontaminasi dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu secara eksternal dan secara internal. Pencegahan kontaminasi yang disebabkan oleh patogen secara eksternal hanya mencegah kontaminasi di daerah permukaan eksplan saja, sedangkan pencegahan kontaminasi secara internal dapat dilakukan dengan cara memberikan bahan kontaminasi yang dapat menyerang secara sistemik sampai ke dalam patogennya.

Berdasarkan hasil pengamatan sterilisasi tahap pertama terhadap pengujian kontaminasi eksplan embrio biji kepel dengan perendaman bahan sterilan  $H_2O_2$ , menunjukkan bahwa pada perlakuan konsentrasi 3%  $H_2O_2$  dengan lama perendaman selama 5 menit serta pada perlakuan konsentrasi 3%  $H_2O_2$  dengan lama perendaman selama 10 menit persentase kontaminasinya adalah sebesar 0%. Kontaminasi yang terjadi pada kedua perlakuan tersebut, merupakan kontaminasi yang paling rendah diantara kontaminasi yang terjadi pada perlakuan yang lainnya.



Gambar 1. Eksplan embrio biji kepel yang terkontaminasi bakteri a) Perlakuan  $\text{H}_2\text{O}_2$  1% + 5 menit b) Perlakuan  $\text{H}_2\text{O}_2$  2% + 5 menit c) Perlakuan  $\text{H}_2\text{O}_2$  2% + 10 menit.

Persentase kontaminasi yang relatif dan cenderung tinggi ditunjukkan oleh perlakuan pemberian  $\text{H}_2\text{O}_2$  2% dengan lama perendaman selama 10 menit yaitu sebesar 13,88%. Gambar 3 (c) menunjukkan kontaminasi yang terjadi pada permukaan media yang sudah ditanami eksplan embrio kepel. Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri ini mulai muncul pada 12 HST. Luas sebaran kontaminasi oleh bakteri yang ditunjukkan oleh perlakuan pemberian  $\text{H}_2\text{O}_2$  dengan konsentrasi 2% selama 10 menit ini lebih luas dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya, sehingga angka persentasenya pun menunjukkan angka paling tinggi. Hal ini dilihat dari tanda-tanda permukaan media yang digunakan untuk menanam eksplan, menunjukkan adanya lendir berwarna putih ke kuning-kuningan. Menurut Widiastoety (2001), kontaminasi yang terjadi pada eksplan yang ditanam dapat disebabkan karena adanya infeksi secara eksternal maupun internal.

Persentase kontaminasi yang cukup tinggi pada penelitian ini dapat disebabkan dari kontaminasi internal, dimana kontaminasi terjadi akibat dari jaringan eksplan embrio kepel yang pada tahap sterilisasi belum tersterilisasi dengan

sempurna. Selain itu kontaminasi yang terjadi pada tahap sterilisasi pertama ini disebabkan konsentrasi  $H_2O_2$  yang diberikan masih kurang tepat, sehingga konsentrasi yang kurang tepat ini dapat menyebabkan proses kontaminasi pada eksplan lebih cepat dan persentase kontaminasi yang ditimbulkan pun lebih tinggi. Rendahnya konsentrasi bahan sterilan berupa  $H_2O_2$  belum mampu menekan kontaminasi yang terjadi pada eksplan. Persentase kontaminasi yang tinggi pada sterilisasi tahap pertama juga menunjukkan bahwa penggunaan bahan sterilan  $H_2O_2$  pada konsentrasi rendah tidak dapat menghilangkan keberadaan agen kontaminasi yang terdapat pada permukaan eksplan embrio kepel sehingga sumber kontaminasi mampu bertahan hidup pada eksplan.

Eksplan yang terkontaminasi oleh bakteri pada penelitian ini sulit untuk dihilangkan, hal ini disebabkan karena pada tahap sterilisasi pertama eksplan yang melalui tahapan perendaman bakterisida dan fungisida yang bersifat sistemik membunuh mikroorganismse masih berupa biji. Biji kepel yang memiliki tekstur keras belum dapat tersterilisasi dengan baik. Waktu perendaman menggunakan bakterisida dan fungisida menjadi salah satu penyebabnya, dengan waktu 60 menit pada biji kepel yang keras ternyata belum mampu menekan kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri. Kontaminasi bakteri yang berasal dari dalam eksplan sulit untuk dihilangkan, tidak seperti kontaminasi yang disabakan oleh jamur yang biasanya terjadi hanya dipermukaan eksplan saja.

Berdasarkan hasil penelitian Rodinah, dkk (2016), yang dilakukan pada biji jelutung rawa bahwa perlakuan  $H_2O_2$  17,67% sangat efektif untuk menghambat kontaminasi pada biji jelutung rawa. Selain itu menurut Nurtjahjaningsih (2009),

bahwa perlakuan perendaman yang dilakukan pada benih pinus merkusii menggunakan larutan hidrogen peroxida ( $H_2O_2$ ) dengan konsentrasi 7% serta lama perendaman berkisar 10 menit, ini terbukti dapat mematahkan dormansi benih. Perlakuan ini juga sekaligus efektif dapat mengatasi sumber kontaminan yang terdapat dan tertempel pada benih pinus merkusii. Apabila dilihat berdasarkan penelitian yang telah dilakukan bahwa pada sterilisasi pertama ini konsentrasi  $H_2O_2$  yang digunakan belum mampu menghambat kontaminasi pada eksplan.

## **2. Persentase *Browning* (%)**

Persentase *browning* merupakan hasil pengamatan yang dilakukan pada eksplan yang mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan. Menurut Fitriani (2003), kalus yang berubah warna menjadi kecoklatan menandakan adanya sintesis senyawa fenolik. Senyawa fenol memiliki sifat toksik pada tanaman dan akan menghambat pertumbuhan eksplan. Proses *browning* yang terjadi menandakan adanya kemunduran fisiologi pada eksplan yang sering dijumpai pada tahapan kultur *in vitro*. Proses *browning* yang sering dijumpai pada tahapan kultur *in vitro* juga, menandakan bahwa pada akhirnya *browning* akan menghambat perkembangan dari suatu eksplan (Sampulan, 2013).

*Browning* merupakan proses keluarnya pigmen yang berwarna coklat atau berwarna hitam pada saat bagian dari tanaman atau bagian dari eksplan terluka. Selama inkubasi eksplan yang ditanam dapat mengalami perubahan warna menjadi coklat atau hitam. Proses *browning* yang terjadi selama inkubasi tersebut dapat menghambat pertumbuhan eksplan.

Berdasarkan hasil pengamatan yang disajikan pada tabel 1 dapat diketahui bahwa semua perlakuan eksplan mengalami persentase *browning*. Persentase

*browning* pada konsentrasi  $H_2O_2$  1% dan lama perendaman selama 5 menit menunjukkan persentase sebesar 50%, persentase *browning* pada perlakuan ini merupakan persentase *browning* paling rendah diantara perlakuan yang lainnya.

Semakin tinggi konsentrasi  $H_2O_2$  yang digunakan sebagai bahan sterilan pada tahap sterilisasi pertama ini menunjukkan, semakin tinggi juga angka persentase *browning* nya. Berdasarkan penelitian Rodinah dkk (2016), besarnya persentase *browning* mungkin disebabkan konsentrasi bahan sterilan yang cukup tinggi. Karena terlihat semakin lama eksplan semakin menurun, warna eksplan mulai menguning dan akhirnya kecoklatan. Hal ini ditunjukkan oleh tahapan sterilisasi pertama, bahwa berdasarkan tabel 1 semua perlakuan mengalami persentase *browning* yang tinggi. Perlakuan pemberian konsentrasi 3%  $H_2O_2$  dengan lama perendaman selama 5 menit dan 10 menit menunjukkan persentase *browning* sebesar 86,11%.

Eksplan embrio kepel mengalami *browning* juga disebabkan karena terjadinya pelukaan yang dilakukan terhadap eksplan, dengan cara menyayat sedikit bagian dari embrio kepel. Hal ini dapat menyebabkan senyawa fenol dan menyebabkan jaringan yang diisolasi menjadi coklat dan gagal tumbuh. Pelukaan pada eksplan dapat memacu stres dan menyebabkan peningkatan aktivitas fenilalanin amonia liasse yang diikuti oleh produksi fenilporpanoid dan menyebabkan pencoklatan (Sri, 2008).

### **3. Jenis dan Saat Kontaminasi**

Kontaminasi yang pada penelitian kali ini diamati dari mulai hari pertama tanam. Pengamatan yang dilakukan pada jenis dan saat kontaminasi embrio biji kepel ini bertujuan untuk mengetahui penyebab kontaminasi dan kapan kontaminasi itu

terjadi. Menurut Akin-Idowu dkk (2009), pada tahapan awal penanaman eksplan sering menyebabkan terjadinya kontaminasi. Pada tahapan ini eksplan yang berasal dari luar (lingkungan tidak steril) dan kemudian dibawa ke dalam lingkungan laboratorium yang memiliki sifat aseptik akan menyebabkan kemungkinan kontaminasi yang besar.

Menurut Putri dkk (2017), kontaminasi pada kultur *in vitro* dapat berkembang cepat secara kompetitif pada lingkungan kultur yang mempunyai ketersediaan nutrien tinggi dan akan berkembang lambat menggunakan strategi anabiosis (pengurangan metabolisme sel pada waktu tertentu saat keadaan lingkungan tidak menguntungkan).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan pada sterilisasi tahap pertama menunjukkan bahwa jenis kontaminasi yang muncul yaitu berupa bakteri, dan waktu tercepat saat kontaminasi yaitu pada 12 HST. Saat kontaminasi tercepat terjadi pada eksplan yang diberi perlakuan konsentrasi  $H_2O_2$  sebesar 2% dengan lama perendaman selama 10 menit. Sterilisasi tahap pertama menunjukkan bahwa semua konsentrasi bahan sterilan hanya mampu menekan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur, sedangkan kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri belum mampu ditekan secara optimal dengan konsentrasi  $H_2O_2$  yang diberikan. Menurut Gunawan (1988) dalam Hardiyadi (2014), untuk mencegah kontaminasi pada bahan tanam yang sudah mengandung kontaminan internal harus diberi perlakuan fungisida sistemik.

## **B. Sterilisasi Tahap Kedua**

Sterilisasi tahap kedua dilakukan pada embrio kepel dengan menggunakan deterjen sebanyak 2 gram/L selama 10 menit, bakterisida dan fungisida sebanyak



2 gram/L selama 60 menit, serta menggunakan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 5%, 10%, 15% selama 10 menit dan 15 menit. Sterilisasi tahap kedua ini dimulai dengan memisahkan bagian biji kepel dengan daging buah, kemudian biji kepel dibelah dan diambil bagian embrionya. Bagian embrio yang sudah diambil kemudian selanjutnya diletakkan pada botol jam steril untuk kemudian direndam dengan menggunakan deterjen selama 5 menit, setelah itu dibilas dengan menggunakan air sebanyak 3 kali. Tabel atau data pengamatan pada sterilisasi kedua ini disajikan pada tabel 2 sebagai berikut

Tabel 2. Pengaruh Sterilisasi terhadap Persentase Hidup, Persentase Kontaminasi, dan Persentase *Browning* Eksplan Embrio Biji Kepel selama 8 Minggu

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup	Persentase Eksplan Kontaminasi	Persentase Eksplan <i>Browning</i>	Saat <i>Browning</i> (HST)
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 menit	100%	0%	0%	-
5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 15 menit	88,89%	0%	11,11%	18
10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 menit	100%	0%	0%	-
10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 15 menit	77,78%	0%	22,22%	15
15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10 menit	100%	0%	0%	-
15% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 15 menit	93,71%	0%	6,29%	18

Tahap sterilisasi yang kedua pada penelitian ini memberikan hasil pengamatan yang berbeda dibandingkan dengan hasil pengamatan pada sterilisasi pertama. Hal ini dikarenakan perlakuan konsentrasi yang diberikan juga berbeda. Hasil pengamatan berdasarkan tabel 2 dapat dilihat bahwa ada perubahan nilai persentase hidup eksplan yang signifikan. Pada sterilisasi yang kedua ini persentase hidup eksplan hidup menunjukkan nilai yang tinggi, sehingga dapat diartikan bahwa semua perlakuan dapat memberi kemungkinan hidup untuk eksplan embrio biji kepel.

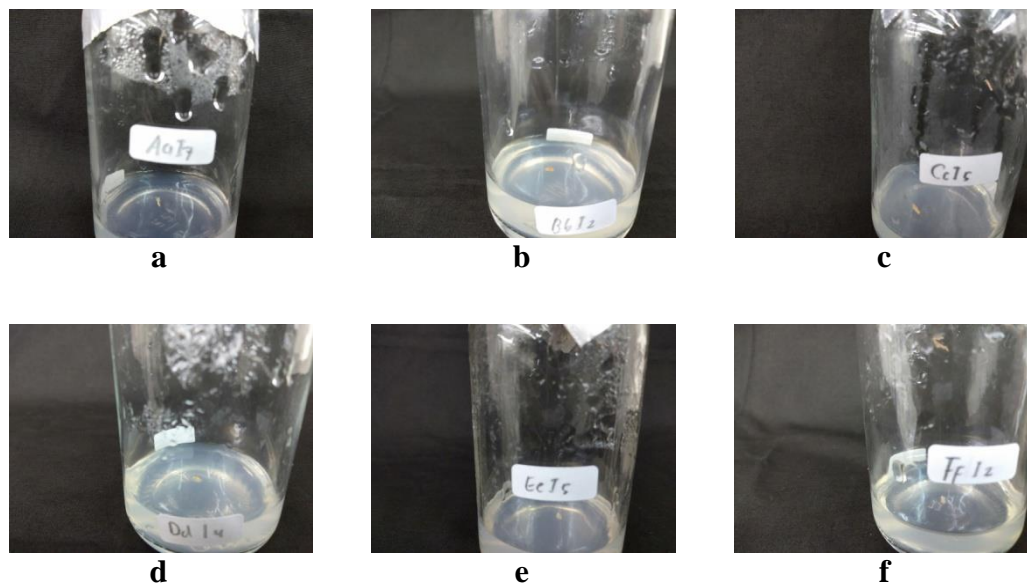
## 1. Persentase Eksplan Hidup (%)

Persentase hidup adalah kemampuan eksplan untuk tumbuh dalam suatu medium secara kultur *in vitro*. Persentase eksplan hidup pada suatu perlakuan yang diberikan biasanya dipengaruhi oleh tingkat persentase kontaminasi dan tingkat persentase *browning*. Persentase eksplan hidup pada penelitian yang telah dilakukan ini menunjukkan bahwa eksplan yang bertahan hidup memiliki ciri, yaitu eksplan embrio biji kepel yang berwarna putih tulang, tidak mengalami *browning*, serta tidak terdapat kontaminasi baik dari bakteri maupun kontaminasi yang disebabkan oleh jamur.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan embrio biji kepel ini menunjukkan tingkat keberhasilan untuk hidup yang tinggi. Ini berarti dari 54 eksplan yang ditanam, tidak ada satupun eksplan yang mengalami kematian. Persentase eksplan yang hidup dapat dilihat pada tabel 2, bahwa eksplan yang berhasil hidup memiliki persentase kontaminasi yang rendah bahkan sama sekali tidak menunjukkan angka kontaminasi.

Berdasarkan gambar 4, eksplan embrio kepel yang hidup pada setiap perlakuan yang diberikan memiliki ciri-ciri yaitu berwarna putih cenderung putih susu dan pada bagian ujung embrio nya memiliki warna coklat kehitaman. Berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan eksplan yang tidak hidup atau tidak tumbuh memiliki warna putih pucat atau dapat dikatakan juga warna eksplan yang tidak hidup ini cenderung lebih ke warna putih pucat, yang menandakan bahwa eksplan yang ditanam jaringan sel nya sudah mengalami

kerusakan sehingga pigmen yang ada pada eksplan embrio ini keluar dan menyebabkan warna eksplan menjadi putih pucat.



Gambar 2. Eksplan embrio kepel yang hidup pada berbagai perlakuan sterilisasi menggunakan  $H_2O_2$  a)  $H_2O_2$  5% + 10 menit b)  $H_2O_2$  5% + 15 menit c)  $H_2O_2$  10% + 10menit d)  $H_2O_2$  10% + 15 menit e)  $H_2O_2$  15% + 10 menit f)  $H_2O_2$  15% + 15 menit

Eksplan embrio biji kepel yang hidup berdasarkan tabel 2 memiliki persentase hidup diatas persentase kemampuan berkecambah suatu benih yaitu sebesar  $>80\%$ . Penambahan NAA 2 ppm dan BAP 0,5 ppm mungkin dapat mempengaruhi terhadap pertumbuhan eksplan embrio biji kepel ini. Untuk mendapatkan hasil kalus yang baik, diperlukan sumber eksplan yang baik pula. Hal yang perlu dipertimbangkan dalam menentukan eksplan yang tepat untuk menghasilkan kalus yang baik adalah pemilihan bagian tanaman sebagai sumber eksplan sebelum dikulturkan (Gunawan 1992). Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini keberhasilan persentase eksplan yang hidup juga dipengaruhi oleh keadaan eksplan yang baik.

Hasil dari tabel 2 menunjukkan bahwa konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% dengan waktu perendaman selama 10 menit sudah mampu memberikan persentase hidup 100%. Persentase hidup sebesar 100% ini juga ditunjukkan oleh eksplan yang diberikan perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% dengan lama perendaman selama 10 menit, dan pada eksplan yang diberikan perlakuan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% dengan waktu perendaman 10 menit. Hal ini menunjukkan bahwa dengan konsentrasi paling rendah pada sterilisasi tahap kedua, sudah mampu menekan kontaminasi jamur dan bakteri serta sudah mampu memberikan persentase hidup yang cukup tinggi.

## **2. Persentase Kontaminasi (%)**

Pengamatan eksplan yang terkontaminasi memiliki tujuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan dari proses sterilisasi baik itu sterilisasi pada eksplan, sterilisasi pada medium, maupun sterilisasi pada alat. Persentase kontaminasi pada eksplan dapat dilihat dari seberapa banyak eksplan yang terkontaminasi oleh sumber kontaminasi seperti bakteri, jamur, dan lain sebagainya. Pengujian pada tingkat kontaminasi eksplan embrio biji kepel dengan berbagai konsentrasi dan waktu lama perendaman dilakukan untuk mengetahui perlakuan yang paling tepat pada proses optimasi. Menurut Akin-Idowu dkk (2009), kontaminasi yang terjadi pada kultur *in vitro* berada pada tahapan awal saat eksplan yang dimasukkan dan ditanam ke dalam media. Tahapan ini, akan membawa eksplan yang dibawa dari luar (lingkungan tidak steril) ke dalam lingkungan laboratorium sehingga memungkinkan eksplan terjadi kontaminasi sangat besar. Kontaminasi yang terjadi pada kultur jaringan terjadi pada tahapan awal inisiasi eksplan terkait dengan tempat dan waktu pengambilan eksplan.

Pada penelitian ini disinfektan atau bahan sterilan yang digunakan berupa  $H_2O_2$ , yaitu dengan berbagai konsentrasi 5%, 10%, dan 15%. Menurut Srivastava dkk (2010), konsentrasi  $H_2O_2$  yang digunakan untuk proses sterilisasi permukaan eksplan yaitu antara 3 sampai 20% dan akan bergantung pada jenis bahan eksplan yang akan ditanam. Hidrogen peroksida atau  $H_2O_2$  sebagai bahan sterilan ini dapat menghambat cendawan dan bakteri dalam proses pertumbuhannya, yaitu dengan cara menghidrolisis sel atau menggumpalkan protein yang terdapat pada protoplasma. Protein yang telah menggumpalkan kehilangan fungsinya sehingga cendawan dan bakteri akan mengalami kematian. Larutan  $H_2O_2$  merupakan bahan sterilan yang ramah lingkungan dibandingkan dengan bahan kimia lainnya, hal ini karena  $H_2O_2$  mudah terurai menjadi air dan oksigen.

Hasil pengamatan yang telah dilakukan eksplan embrio biji kepel ini tidak menunjukkan adanya kontaminasi baik itu berupa kontaminasi bakteri, jamur, dan lain sebagainya. Hal ini dapat dilihat pada tabel 2 bahwa persentase kontaminasi pada semua perlakuan yaitu perlakuan A deterjen 2 g/l + Bakterisida dan Fungisida 2 g/l + Larutan  $H_2O_2$  5% 10 menit, perlakuan B deterjen 2 g/l + Bakterisida dan Fungisida 2 g/l + Larutan  $H_2O_2$  5% 15 menit, perlakuan C deterjen 2 g/l + Bakterisida dan Fungisida 2 g/l + Larutan  $H_2O_2$  10% 10 menit, perlakuan D deterjen 2 g/l + Bakterisida dan Fungisida 2 g/l + Larutan  $H_2O_2$  10% 15 menit, perlakuan E deterjen 2 g/l + Bakterisida dan Fungisida 2 g/l + Larutan  $H_2O_2$  15% 10 menit, dan perlakuan F deterjen 2 g/l + Bakterisida dan Fungisida 2 g/l + Larutan  $H_2O_2$  15% 15 menit menunjukkan persentase kontaminasi sebesar 0% yang berarti dari mulai awal tanam eksplan sampai akhir pengamatan tidak terjadi kontaminasi sama sekali.

Perlakuan A yaitu yaitu deterjen 2 g/l + Bakterisida dan Fungisida 2 g/l + Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% 10 menit sudah mampu menghambat kontaminasi eksplan dari berbagai sumber eksplan. Perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% dengan lama perendama 10 menit pada penelitian yang telah dilakukan ini memiliki konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> paling rendah dengan lama perendaman paling sebentar, namun hasil persentase kontaminasi nya pun sudah menunjukkan 0%. Prosedur yang diterapkan pada tahap sterilisasi permukaan, dengan cara menggabungkan etanol dengan NaOCl atau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ini sudah dapat dipastikan dapat mengurangi kontaminasi yang terjadi pada beberapa jenis tanaman (Oyebanji *et al.*, 2009). Kontaminasi yang terjadi dapat dihilangkan atau diminimalisir apabila dilakukan dua tahap sterilisasi atau digunakan dua jenis bahan sterilan (Benazir *et al.*, 2013).

Kontaminasi merupakan gangguan yang sering terjadi pada kultur jaringan, yang dapat terdiri dari bakteri, jamur, atau virus (Mariska dan Sukmadjaja, 2003). Untuk mencegah kontaminasi, dapat dilakukan teknik sterilisasi yang tepat baik terhadap alat maupun bahan serta lingkungan kerja. Tujuan dari kegiatan sterilisasi ini sendiri yaitu untuk mengeliminasi patogen ataupun cendawan yang, yang pada proses sterilisasi sebelumnya masih terbawa pada eksplan. Cendawan atau patogen yang terbawa ini dapat menyebabkan kontaminasi yang akan menghambat pertumbuhan eksplan menjadi tanaman utuh. Adapun bahan sterilan atau desinfektan yang dapat digunakan pada sterilisasi eksplan pada kultur *in vitro* diantaranya yang umum dikenal adalah HgCl<sub>2</sub> dan NaClO (Gunawan, 1992; Sugiyama, 1999).

### 3. Saat Eksplan *Browning* (hari)

Saat eksplan *browning* adalah suatu indikator yang digunakan untuk mengetahui kecepatan pada saat hari ke berapa eksplan mengalami pencoklatan atau yang disebut *browning*. Pada penelitian ini eksplan *browning* diamati setiap 3 hari sekali.

Berdasarkan tabel 2, eksplan embrio kepel yang mengalami *browning* paling cepat terjadi pada perlakuan yang diberi  $H_2O_2$  dengan konsentrasi 10% dan lama waktu perendaman selama 15 menit. *Browning* tercepat terjadi pada saat 15 HST dengan persentase akhir *browning* mencapai 22,22%.

### 4. Persentase *Browning* (%)

Berdasarkan penelitian Sabar (2013), penggunaan bahan sterilan pada konsentrasi yang cukup tinggi akan menyebabkan *browning* dan menurunkan kemampuan regenerasi eksplan *paulownia*. Seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Yang (2009), bahwa etanol dan pemutih dengan konsentrasi yang tinggi dapat merusak tanaman muda dan menghambat induksi pucuk baru. Tekstur eksplan embrio biji kepel yang memiliki jaringan yang tipis dan tekstur eksplan yang kecil, berpengaruh juga terhadap tingkat persentase *browning*.



Gambar 3. Eksplan embrio kepel yang mengalami *browning* pada berbagai perlakuan sterilisasi menggunakan  $H_2O_2$  (a)  $H_2O_2$  5% + 15 menit (b)  $H_2O_2$  10% + 15 menit

Hasil pengamatan pada tabel 2 menunjukkan bahwa persentase *browning* pada setiap perlakuan memiliki persentase yang berbeda, persentase *browning* yang relatif rendah terjadi pada perlakuan pemberian H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 5% dan 15% serta lama perendaman selama 10 menit yaitu sebesar 0%.

*Browning* atau dengan kata lain proses pencoklatan akan menunjukkan gejala warna kecoklatan pada eksplan. Proses *browning* juga akan menghambat pertumbuhan eksplan yang sudah ditanam. Menurut Queiroz dkk (2008), *browning* pada suatu eksplan akan terjadi apabila enzim polifenol oksidase, yang mengakibatkan terjadinya oksidasi senyawa fenol berubah menjadi quinon yang memproduksi pigmen berwarna coklat ketika jaringan terluka.

Menurut Fitriani (2003), warna coklat yang terjadi pada kalus menandakan sintesis senyawa fenolik. Senyawa fenol memiliki sifat toksik bagi tanaman sehingga pada akhirnya dapat menghambat pertumbuhan. *Browning* yang terjadi akan mengakibatkan kemunduran fisiologi dari suatu eksplan yang sering dijumpai pada kultur *in vitro*. Mundurnya fisiologi dari suatu eksplan juga akan mengakibatkan pertumbuhan eksplan yang terganggu (Sampulan, 2013).

Berdasarkan tabel 2 juga menunjukkan bahwa persentase *browning* pada optimasi sterilisasi embrio biji kepel ini memiliki persentase *browning* yang cukup tinggi, perlakuan yang memiliki persentase *browning* paling tinggi adalah sebesar 22,22%. Nilai persentase yang relatif tinggi yaitu terjadi pada eksplan yang diberi perlakuan 10% dengan lama perendaman 15 menit. Tingkat *browning* pada eksplan cukup besar, hal ini dikarenakan tidak adanya penggunaan perlakuan yang dapat mengurangi terjadinya *browning*. Penggunaan bahan sterilan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan etanol dengan konsentrasi



yang cukup tinggi dapat menyebabkan *browning* dan menurunkan kemampuan regenerasi eksplan embrio kepel

Nilai persentase *browning* yang relatif tinggi ini dapat disebabkan karena konsentrasi sterilan yaitu  $H_2O_2$  yang tinggi. Semakin tinggi konsentrasi bahan sterilan maka semakin tinggi juga kemungkinan tingkat *browning* pada eksplan. Hal ini sesuai dengan penelitian Sabar (2013), penggunaan bahan sterilan dengan konsentrasi yang cukup tinggi dapat menyebabkan *browning* dan menurunkan kemampuan regenerasi eksplan *paulownia*.

Adanya *browning* yang terjadi pada eksplan ini ditandai dengan perubahan warna. Warna eksplan yang pada awal tanam memiliki warna putih tulang atau putih cream ini mengalami perubahan warna yaitu pada 15 HST. Pada pengamatan eksplan berubah sedikit demi sedikit, yang awalnya memiliki warna yang putih menjadi kekuningan dan pada akhirnya eksplan berubah menjadi warna coklat.

Gejala *browning* yang terjadi ini dapat dikarenakan sintesis senyawa fenolik metabolit sekunder. Menurut Fitriani (2003), warna coklat yang terjadi pada kalus menandakan sintesis senyawa fenolik. Senyawa fenol memiliki sifat toksik bagi tanaman sehingga pada akhirnya dapat menghambat pertumbuhan. Gejala *browning* yang terjadi ditandai dengan mulai berubahnya warna eksplan dari warna putih menjadi warna coklat muda sampai ada yang berwarna coklat tua. Perubahan warna yang terjadi pada eksplan embrio biji kepel ini disebabkan akibat adanya luka pada eksplan sehingga menyebabkan senyawa fenol yang terdapat pada sitoplasma keluar dan selanjutnya bereaksi dengan  $O_2$  yang terdapat pada larutan sterilan yaitu larutan  $H_2O_2$  dan menyebabkan terjadinya sintesis senyawa fenolik. Semakin tinggi

konsentrasi  $H_2O_2$  yang diberikan maka akan semakin tinggi pula persentase *browning* yang didapatkan.

Menurut Rico *dkk* (2017), Perlakuan bahan pensteril hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) memiliki persentase kecil dalam parameter *browning* sehingga sel-sel eksplan masih hidup dan ada kemungkinan untuk tumbuh, selain itu bahan pensteril ini juga mampu menekan kontaminan dengan optimal sehingga jumlah eksplan steril dan tidak mengalami *browning* yang akhirnya mampu menginduksi tunas ada dalam jumlah lebih banyak dibandingkan dengan perlakuan lainnya