

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi eksplan merupakan salah satu faktor penting yang sangat mempengaruhi keberhasilan dari kultur *in vitro*. Proses dari sterilisasi bertujuan untuk mencegah tumbuhnya kontaminan baik berupa bakteri maupun jamur yang dapat menyebabkan terganggunya pertumbuhan eksplan bahkan dapat menyebabkan eksplan mati. Kontaminan akan bersaing dengan eksplan untuk mendapatkan nutrisi, sehingga eksplan akan kalah dengan adanya kontaminasi, oleh karena itu sterilisasi eksplan yang tepat sangat diperlukan yang bertujuan untuk mendapatkan metode sterilisasi yang tepat untuk digunakan pada eksplan biji kepel yang akan ditanam. Sterilisasi eksplan dapat dilakukan dengan berbagai bahan sterilisasi. Pada penelitian ini, proses sterilisasi dilakukan dengan menggunakan hidrogen peroksida (H_2O_2). Konsentrasi H_2O_2 yang digunakan bervariasi sesuai pada perlakuan.

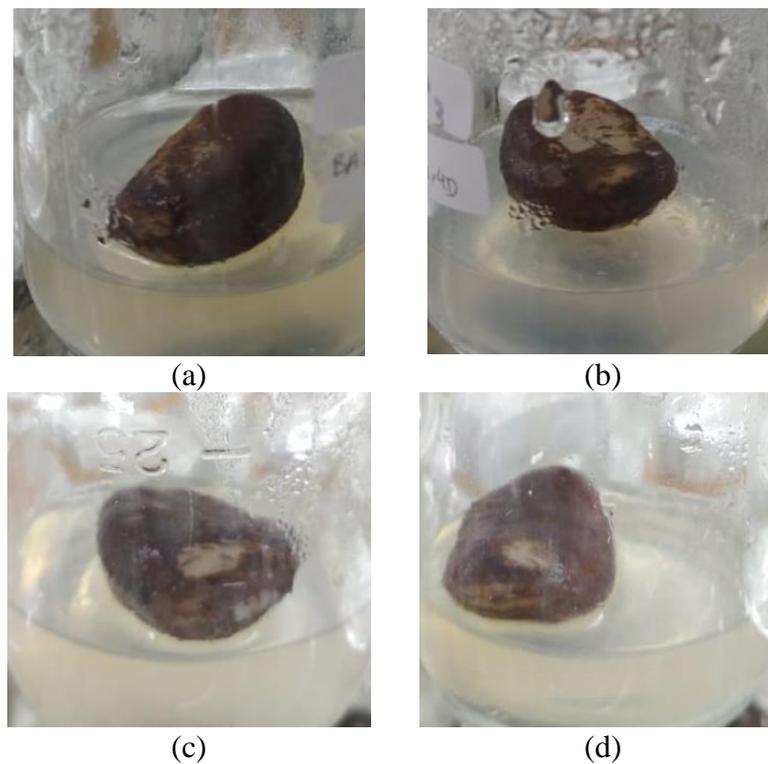
Sterilisasi dilakukan pada setiap biji kepel yang akan diinokulasikan pada medium MS + BAP 0,5 ppm + 2,4D 2 ppm dan dilaksanakan sebelum proses inokulasi. Pengamatan dilakukan selama 8 minggu, dengan variabel pengamatan berikut ini: 1) Persentase hidup; 2) Persentase kontaminasi; 3) Persentase *browning*; 4) Jenis kontaminasi; 5) Saat kontaminasi; dan 6) Saat *browning*. Hasil pengamatan optimasi sterilisasi eksplan biji kepel dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 1. Pengaruh sterilisasi terhadap persentase hidup, persentase *browning*, persentase kontaminasi, jenis kontaminasi, saat kontaminasi, dan saat *browning* eksplan biji kepel pada 8 MST

Perlakuan	Persentase Eksplan Hidup (%)	Persentase Eksplan Kontaminasi (%)	Persentase Eksplan <i>Browning</i> (%)	Jenis Kontaminasi	Saat Kontaminasi (Hari ke-)	Saat <i>Browning</i> (Hari ke-)
H ₂ O ₂ 5% 5 menit	0	100	0	Bakteri	9	-
H ₂ O ₂ 5% 15 menit	0	77,78	22,22	Bakteri	26	11
H ₂ O ₂ 10% 5 menit	44,44	55,56	0	Bakteri	50	-
H ₂ O ₂ 10% 15 menit	100	0	0	-	-	-
H ₂ O ₂ 15% 5 menit	100	0	0	-	-	-
H ₂ O ₂ 15% 15 menit	100	0	0	-	-	-

A. Persentase Hidup

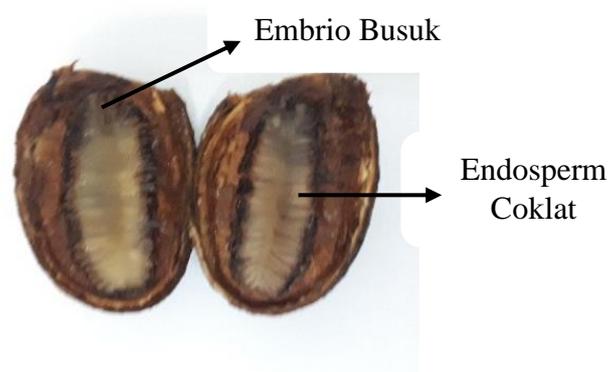
Persentase eksplan hidup menunjukkan kemampuan eksplan untuk tumbuh dan berkembang dalam medium tempat tumbuhnya. Persentase hidup dipengaruhi oleh persentase kontaminasi dan persentase *browning*. Tujuan dari pengamatan persentase hidup ialah untuk mengetahui seberapa besar pengaruh bahan sterilan dalam proses sterilisasi eksplan yang digunakan dalam penelitian. Persentase eksplan hidup adalah kondisi ditandai dengan tidak terjadinya kontaminasi maupun *browning* pada eksplan. Gambar eksplan hidup disajikan pada gambar 2.



Gambar 1. Eksplan biji kepel hidup selama 8 minggu (a) H₂O₂ 10% selama 5 menit, (b) H₂O₂ 10% selama 15 menit, (c) H₂O₂ 15% selama 5 menit, (d) H₂O₂ 15% selama 15 menit

Hasil uji sterilisasi terhadap persentase hidup eksplan biji kepel pada tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan H₂O₂ 10% selama 15 menit, H₂O₂ 15% selama 5 menit, dan H₂O₂ 15% selama 15 menit, telah mampu menekan kontaminasi baik jamur maupun bakteri dan memberikan persentase hidup masing-masing sebesar 100%, sedangkan perlakuan dengan penggunaan H₂O₂ 10% selama 5 menit mampu menekan kontaminasi jamur namun belum mampu menekan kontaminasi yang diakibatkan oleh bakteri sehingga memberikan persentase hidup sebesar 44,44%. Persentase hidup eksplan pada perlakuan H₂O₂ 10% selama 15 menit, H₂O₂ 15% selama 5 menit, dan H₂O₂ 15% selama 15 menit menunjukkan persentase eksplan hidup yang tinggi akan tetapi tidak terjadi tumbuh kalus serta pada akhirnya terjadi kerusakan embrio. Kerusakan embrio diakibatkan karena pembusukan embrio serta

endosperm yang berwarna coklat. Biji kepel memang sulit berkecambah dikarenakan kondisi kelembaban pada media yang digunakan. Lembabnya media dapat mengakibatkan biji kepel menjadi rusak dan busuk sehingga biji tersebut tidak dapat berkecambah (Isnaeni dan Habibah, 2014). Selain itu, pembusukan embrio dan pencoklatan endosperm diduga karena banyaknya air yang ada di dalam jaringan eksplan akibat terjadinya imbibisi namun biji tidak dapat berkecambah diakibatkan biji kepel memiliki masa dormansi yang lama sekitar 4-6 bulan. Kulit biji kepel yang bersifat keras menjadi salah satu faktor perkecambahan terhambat. Gambar kerusakan embrio disajikan pada gambar 3.



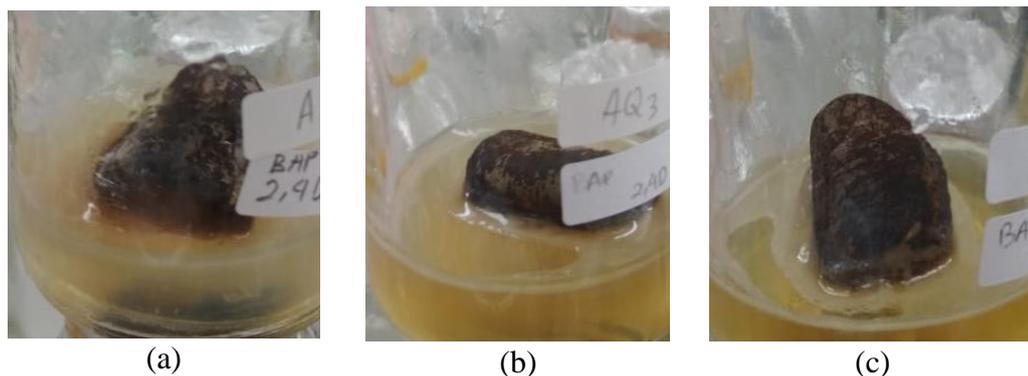
Gambar 2. Bagian dalam eksplan biji kepel setelah 6 bulan inkubasi

Penggunaan H_2O_2 pada konsentrasi tinggi diduga mampu meminimalisir sumber kontaminasi baik internal maupun eksternal. Selain itu penggunaan H_2O_2 10% dengan lama perendaman 15 menit juga mampu menekan terjadinya *browning* sebesar 0%. Konsentrasi H_2O_2 10% dengan lama perendaman 15 menit diduga dapat mencegah senyawa fenol yang terdapat pada eksplan keluar akibat adanya pelukaan. Menurut Aris (2018), penggunaan H_2O_2 yang cukup pekat mampu melapisi eksplan sehingga tidak terjadi proses oksidasi. Proses perendaman yang

lama sama halnya dengan pembilasan yang dilakukan terus menerus untuk menghilangkan kandungan senyawa fenol yang terkandung pada eksplan (Budiawan, 2010 dalam Aris, 2018). Uji sterilisasi dengan menggunakan H_2O_2 10% selama 15 menit merupakan metode sterilisasi yang optimum dalam sterilisasi eksplan biji kepel dibuktikan dengan persentase kontaminasi 0%, persentase *browning* 0%, dan persentase hidup 100%.

B. Persentase Kontaminasi

Persentase eksplan yang terkontaminasi tidak terlepas dari sterilitas bahan eksplan maupun lingkungan tanam eksplan. Kontaminasi pada bahan tanaman yang dikulturkan dapat terjadi karena terdapatnya infeksi baik dari dalam maupun luar. Pencegahan kontaminasi dari luar dapat dilakukan dengan menggunakan sterilisasi permukaan, sedangkan untuk kontaminasi yang disebabkan dari dalam bahan tanam dapat dilakukan dengan pemberian fungisida maupun bakterisida yang bersifat sistemik. Gambar eksplan terkontaminasi disajikan pada gambar 4.



Gambar 3. Eksplan biji kepel mengalami kontaminasi bakteri selama 8 minggu (a) H_2O_2 5% selama 5 menit, (b) H_2O_2 5% selama 15 menit, (c) H_2O_2 10% selama 5 menit

Pada uji sterilisasi ini didapatkan eksplan yang terkontaminasi oleh bakteri. Kontaminan berupa bakteri ditandai oleh adanya warna putih menyerupai lendir

berwarna putih kecoklatan atau putih keruh pada medium di sekitar eksplan biji kepel. Sterilisasi pada perlakuan H₂O₂ 10% selama 15 menit, H₂O₂ 15% selama 5 menit, dan H₂O₂ 15% selama 15 menit, mampu menekan terjadinya pertumbuhan kontaminasi baik jamur maupun bakteri secara maksimal, hal ini dibuktikan dengan tingkat dari kontaminasi sebesar 0%. Kontaminasi oleh bakteri terjadi pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 5 menit, H₂O₂ 5% selama 15 menit, dan H₂O₂ 10% selama 5 menit. Kontaminasi pada perlakuan H₂O₂ 10% selama 5 menit dengan persentase kontaminasi sebesar 55,56%. Pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 15 menit terjadi kontaminasi dengan persentase 77,78%, sedangkan pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 5 menit terjadi kontaminasi dengan persentase kontaminasi sebesar 100%.

Hasil uji sterilisasi dari enam perlakuan yang diuji coba terdapat tiga perlakuan diantaranya yang mengalami kontaminasi, hal ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya konsentrasi bahan sterilan yang kecil dan lama perendaman yang kurang sehingga belum mampu menekan pertumbuhan bakteri secara maksimal pada eksplan. Kontaminasi ini diduga disebabkan oleh bakteri endogen yang berasal dari tanaman. Menurut Fahmadi (2006) kontaminasi yang bersifat endogen merupakan sumber kontaminasi yang berasal dari dalam jaringan tanaman, seperti mikrobia endofit. Bakteri ini terdapat di dalam tanaman, sehingga dapat bebas dari proses sterilisasi. Kontaminasi diduga tidak berasal dari medium yang digunakan untuk proses pertumbuhan dan perkembangan eksplan, karena pada medium MS yang digunakan telah ditambahkan *Plant Preservative Mixture* (PPM) yang memiliki peran meminimalisir terjadinya kontaminasi. PPM merupakan larutan kimia yang digunakan sebagai bahan tambahan dalam kultur *in*

vitro tanaman untuk mencegah sebagian besar kontaminasi baik berupa bakteri maupun jamur. Menurut Sharaf and Weathers (2006) dalam Wahyuni (2018), PPM merupakan salah satu bahan biosida cair yang termasuk dalam golongan isotiazolon yang mampu menghambat jamur dan mikroba dalam perbanyakan secara kultur *in vitro*.

Hal ini berarti konsentrasi bahan sterilan berupa H₂O₂ dengan konsentrasi 10% ke atas telah mampu mematikan jamur dan bakteri dalam eksplan. H₂O₂ adalah salah satu bahan sterilan yang dapat digunakan pada proses sterilisasi eksplan. Penggunaan larutan H₂O₂ berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dilakukan oleh Farooq *et al.*, (2002) penggunaan 12% H₂O₂ dan 15 menit waktu perendaman mampu mencegah kontaminasi pada permukaan eksplan biji srikaya sebanyak 50% dan sebagian besar berubah menjadi hitam karena mengalami toksisitas.

C. Persentase *Browning*

Beberapa macam tanaman khususnya tanaman yang merupakan tanaman tropika memiliki kandungan senyawa fenol yang tinggi dan dapat teroksidasi saat sel dilukai atau terjadi senesens (George dan Sherrington, 1984 dalam Hutami 2008). Akibatnya jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau kehitaman dan gagal tumbuh. Pencoklatan atau *browning* pada jaringan terjadi karena adanya aktivitas enzim pengoksidasi yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase (Lerch 1981 dalam Hutami 2008) yang dilepaskan atau disintesis dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai. *Browning* atau pencoklatan yang ditandai dengan perubahan warna menjadi coklat pada eksplan biji kepel yang dilukai setelah dilakukan inokulasi yang mengakibatkan tidak terjadinya

pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Gambar eksplan *browning* disajikan pada gambar 5.



Gambar 4. Eksplan biji kepel mengalami *browning* pada perlakuan H_2O_2 5% selama 15 menit pada minggu ke-2

Hasil dari pengamatan persentase *browning* dapat dilihat pada Tabel 1 persentase *browning* yang terjadi pada perlakuan H_2O_2 5% selama 5 menit, H_2O_2 10% selama 5 menit, H_2O_2 10% selama 15 menit, H_2O_2 15% selama 5 menit, dan H_2O_2 15% selama 15 menit masing-masing sebesar 0% atau tidak terjadi *browning*. *Browning* terjadi pada perlakuan H_2O_2 pada perlakuan H_2O_2 5% selama 15 menit terjadi sebesar 22,22%. Adanya persentase eksplan *Browning* dapat diakibatkan oleh proses biologis tanaman yang mengeluarkan senyawa berupa senyawa fenol. Pengeluaran senyawa fenol yang tinggi dapat mengakibatkan kematian pada eksplan. Menurut Rineksane (2015) pertumbuhan eksplan kultur *in vitro* dapat dihambat oleh senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan karena bereaksi dengan oksigen yang mengakibatkan terjadinya pencoklatan atau *browning* pada permukaan eksplan. Menurut Sulistyio et al (2017) dalam penelitiannya disebutkan bahwa bahan pensteril hidrogen peroksida dengan konsentrasi 17,6% pada tanaman sirsak ratu menghasilkan tingkat kontaminasi yang tergolong rendah dengan tingkat

browning yang rendah juga sehingga diperoleh jumlah eksplan hidup yang tinggi. Jika dilihat dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat dilihat bahwa bahan pensteril H₂O₂ dengan konsentrasi 10% dan lama perendaman 15 menit pada eksplan biji kepel juga telah mampu menekan kontaminasi serta *browning* yang terjadi pada eksplan.

D. Jenis Kontaminasi

Jenis kontaminasi yang sering terjadi pada kultur *in vitro* tanaman yaitu kontaminasi yang terjadi akibat bakteri. Cara mengetahui jenis kontaminan ini dapat dilihat dari ciri-ciri fisik yang muncul pada eksplan maupun pada media kultur. Apabila terkena kontaminasi bakteri maka pada sekitar maupun eksplan itu sendiri akan terlihat adanya lendir, hal ini disebabkan bakteri langsung menyerang terhadap bagian jaringan dari eksplan.

Jenis kontaminasi yang terjadi pada penelitian ini masing-masing perlakuan sama yaitu kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri. Jenis kontaminan berupa bakteri ditandai oleh adanya warna putih menyerupai lendir berwarna putih kecoklatan pada medium di sekitar eksplan biji kepel. Pada perlakuan H₂O₂ 10% selama 15 menit, H₂O₂ 15% selama 5 menit, dan H₂O₂ 15% selama 15 menit dapat mengatasi kontaminasi baik jamur dan bakteri sehingga persentase kontaminasi sebesar 0%. Kontaminasi bakteri terjadi pada 3 perlakuan yaitu H₂O₂ 5% selama 5 menit, H₂O₂ 5% selama 15 menit, dan H₂O₂ 10% selama 5 menit. Kontaminasi pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 5 menit dengan persentase kontaminasi sebesar 100%. Pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 15 menit terjadi kontaminasi dengan persentase

77,78%, sedangkan pada perlakuan H₂O₂ 10% selama 5 menit terjadi kontaminasi dengan persentase kontaminasi sebesar 55,56%.

Persentase kontaminasi pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 5 menit, H₂O₂ 5% selama 15 menit, dan H₂O₂ 10% selama 5 menit yang cukup tinggi menunjukkan bahwa metode sterilisasi belum dapat mencegah kontaminan bakteri secara maksimal, hal ini diduga karena rendahnya konsentrasi dari larutan serta lama perendaman yang dilakukan belum efektif, namun diduga pula kontaminasi terjadi dikarenakan eksplan yang digunakan mengandung kontaminasi dari dalam jaringan tanaman. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Rismayani dan Hamzah (2010) yang menyatakan bahwa semakin sedikit konsentrasi dari bahan sterilan yang digunakan maka eksplan semakin rentan terhadap patogen, namun apabila semakin tinggi konsentrasi dari bahan sterilan maka perkembangan jaringan eksplan menjadi terhambat bahkan mati. Selain itu menurut Mariska dan Sukmadjaja (2003) apabila kontaminan tetap ada maka konsentrasi dan lama perendaman sterilan dapat ditingkatkan.

E. Saat Kontaminasi

Kontaminasi pada kultur *in vitro* dapat berasal dari eksplan, organisme kecil yang masuk ke dalam media, botol kultur atau alat-alat tanam yang kurang steril, lingkungan kerja dan ruang kultur yang kotor serta kecerobohan dalam pelaksanaan (Gunawan, 1992). Pada kultur *in vitro*, eksplan sangat rentan terserang jamur maupun bakteri. Hasil penelitian ini menunjukkan pada perlakuan H₂O₂ 10% selama 15 menit, H₂O₂ 15% selama 5 menit, dan H₂O₂ 15% selama 15 menit tidak terjadi kontaminasi (0%) pada eksplan selama 8 minggu pengamatan. Pada perlakuan H₂O₂

5% selama 5 menit, H₂O₂ 5% selama 15 menit, dan H₂O₂ 10% selama 5 menit terjadi kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri. Kontaminasi pada perlakuan H₂O₂ 10% selama 5 menit terjadi pada hari ke-50. Pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 15 menit terjadi kontaminasi pada hari ke-26, sedangkan pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 5 menit terjadi kontaminasi pada hari ke-9. Semakin singkat masa perendaman serta semakin kecil konsentrasi dari larutan H₂O₂ maka semakin cepat pula pertumbuhan dari kontaminan. Pada semua perlakuan mampu menekan pertumbuhan jamur namun pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 5 menit, H₂O₂ 5% selama 15 menit, dan H₂O₂ 10% selama 5 menit belum mampu menekan pertumbuhan bakteri yang lebih cepat yaitu pada hari ke-9. Hal ini diduga karena bakteri yang biasanya bersifat endogen dan sporanya berada didalam eksplan sehingga tidak cukup diatasi dengan sterilisasi permukaan. Konsentrasi yang tinggi dan lama perendaman eksplan pada bahan sterilan yang diberikan diduga telah mampu membunuh spora yang berada di dalam eksplan dan mampu menekan pertumbuhan kontaminan. Konsentrasi H₂O₂ yang digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan biasanya berkisar 3-20% tergantung pada jenis bahan tanaman yang digunakan (Martiansyah dkk., 2013). Hidrogen peroksida (H₂O₂) dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menghidrolisis sel atau menggumpalkan protein yang terdapat pada protoplasma. Protein yang telah menggumpal kehilangan fungsinya sehingga bakteri dan cendawan mengalami kematian (Martiansyah dkk., 2013).

F. Saat Browning

Browning terlihat dengan munculnya warna coklat atau hitam di bagian yang mengalami pelukaan saat pengirisan eksplan hingga akhirnya seluruh bagian eksplan tampak berwarna coklat. *Browning* yang terjadi sering membuat pertumbuhan dan perkembangan eksplan menjadi terhambat terhambat. Hasil dari pengujian sterilisasi didapatkan eksplan yang tidak terjadi *browning* pada perlakuan H₂O₂ 10% selama 15 menit, H₂O₂ 15% selama 5 menit, dan H₂O₂ 15% selama 15 menit pada eksplan selama 8 minggu pengamatan. *Browning* terjadi pada perlakuan H₂O₂ 5% selama 15 menit terjadi pada hari ke 11 pengamatan.

Browning terjadi akibat proses biologis tanaman yang mengeluarkan senyawa berupa senyawa fenol. Proses *browning* juga sering terjadi karena rangsangan kimia, seperti aktivitas enzim pengoksidasi yang mengandung tembaga (Cu²⁺) seperti polifenol oksidase dan tirosinase yang dilepaskan dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai (Hutami, 2008). Santoso dan Nursandi (2004) mengungkapkan bahwa terjadinya pencoklatan (*Browning*) diakibatkan oleh sistem biologis dari tanaman sebagai respon terhadap pengaruh fisik atau biokimia seperti pengupasan, memar, pemotongan, serangan penyakit dan kondisi yang tidak normal. Enzim pengoksidasi dalam keadaan normal akan tertahan dalam ruang berbeda didalam sel dan akan keluar saat sel dilukai atau hampir mati (Hutami 2008). Penghambatan pertumbuhan dan perkembangan yang tidak dapat diperbaiki terjadi ketika senyawa fenol teroksidasi menjadi senyawa aktif quinon yang tinggi kemudian memutar, memolimerse dan mengoksidasi protein menjadi senyawa melanat yang makin meningkat (Hutami 2008). Metabolisme fenol mempengaruhi

sistem kultur *in vitro* secara positif dengan metabolisme auksin, tetapi oksidasi fenol yang berubah menjadi quinon dan senyawa lain yang sangat beracun dapat menyebabkan pencoklatan medium serta kematian eksplan (Hutami 2008). Jaringan yang dilukai akan berubah warna menjadi kecoklatan sehingga dapat menyebabkan eksplan gagal tumbuh. Kecepatan eksplan mengalami *browning* dapat dilihat melalui waktu eksplan mengalami *browning* setelah dilakukan penanaman.