

**PENGARUH HIDROGEN PEROKSIDA TERHADAP KEBERHASILAN  
STERILISASI BIJI KEPEL (*Stelechocarpus burahol* [Bl.] Hook. F. &  
Thomson) SECARA KULTUR *IN VITRO***

**Nandini Ayuningtias, Ety Handayani, Innaka Ageng Rineksane**

Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah  
Yogyakarta

**ABSTRACT**

*Kepel (Stelechocarpus burahol [Bl.] Hook. F. & Thomson) belongs to Annonaceae family which is one of the endemic flora in Special Region of Yogyakarta. Conventional cultivation of kepel plants takes a long time therefore, cultivation through tissue culture was implemented. The aim of this research was to obtain proper method of sterilizing kepel seeds using Hydrogen Peroxide.*

*This research was carried out in the Tissue Culture Laboratory of the Faculty of Agriculture, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta in 2018. The research methods used completely randomized design (CRD) with 6 treatments and 3 replication. The treatment of this research were 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 minutes, 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 minutes, 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 minutes, 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 minutes, 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5 minutes, and 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 minutes each treatment was immersion in kepel seed explants.*

*The results showed that treatment with 10% concentrate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 15 minutes immersion was the best sterilization method supported by high percentage of live explants (100%), lowest percentage of contaminant (0%), and lowest browning percentage (0%).*

Keywords: *Burahol, Tissue culture, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sterilization seeds*

**INTISARI**

Kepel (*Stelechocarpus burahol* [Bl.] Hook. F. & Thomson) merupakan salah satu famili *Annonaceae* yang telah ditetapkan menjadi salah satu flora identitas Daerah Istimewa Yogyakarta. Perbanyakkan tanaman kepel secara konvensional memerlukan waktu yang lama, sehingga dilakukan upaya perbanyakkan dalam waktu singkat melalui kultur *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode sterilisasi biji kepel yang tepat menggunakan Hidrogen Peroksida.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada tahun 2018. Penelitian ini dilakukan menggunakan metode percobaan laboratorium faktor tunggal yang disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebanyak 6 perlakuan dengan 3 ulangan yaitu perendaman menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada eksplan biji kepel dengan masing masing perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 5 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 15 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 5 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 15 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 5 menit, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 15 menit.

Hasil menunjukkan bahwa perlakuan dengan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 15 menit merupakan metode sterilisasi terbaik yang didukung persentase eksplan

hidup yang tinggi (100%), persentase kontaminasi terdendah (0%), dan persentase *browning* terendah (0%).

Kata kunci : *Burahol, kultur jaringan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sterilisasi biji*

## PENDAHULUAN

Tanaman kepel atau burahol (*Stelechocarpus burahol* [Bl.] Hook. F. & Thomson) termasuk salah satu jenis tanaman buah. Jenis ini merupakan salah satu famili *Annonaceae* yang telah ditetapkan menjadi salah satu flora identitas Daerah Istimewa Yogyakarta. Pada saat ini tanaman kepel sudah sangat jarang dan mulai sulit ditemukan. Tanaman kepel telah masuk dalam daftar tanaman langka (Mogea *et al.*, 2001 dalam Hatmi dkk., 2014).

Hasil survey tahun 2011 menunjukkan bahwa keberadaan tanaman kepel sangat terbatas, dan umurnya kebanyakan sudah lebih dari 20 tahun, bahkan ada yang sekitar 50 tahun. Budidaya tanaman kepel biasanya hanya dilakukan melalui persemaian biji dan membutuhkan waktu yang lama (Mogea *et al.* 2001). Metode perbanyakan vegetatif menjadi salah satu upaya pelestarian terhadap tanaman kepel. Salah satu bentuk perbanyakan vegetatif pada tanaman kepel yaitu dengan cara kultur *in vitro*.

Perbanyakan secara *in vitro* merupakan salah satu alternatif untuk dapat menghasilkan bibit yang baik dalam jumlah yang banyak. Tingginya kontaminasi merupakan salah satu hal yang menjadi kendala dalam kultur *in vitro*. Sumber kontaminasi dapat berasal dari eksplan, media, alat dan lingkungan yang tidak steril. Sehingga perlu dilakukan sterilisasi eksplan, media, alat dan lingkungan kerja (Gunawan, 1992). Tahap sterilisasi permukaan eksplan merupakan tahap awal perkembangan kultur *in vitro*. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara, baik secara fisik maupun kimia. Keefektifan zat antimikrobia tergantung konsentrasi, jumlah dan jenis mikroorganisme, suhu, bahan organik terlarut dan pH (Pelczar dan Chan, 1988).

Teknik sterilisasi permukaan banyak digunakan untuk menghilangkan kontaminan yang terdapat pada permukaan eksplan. Selama proses sterilisasi, eksplan harus tetap hidup dan hanya kontaminan yang dieliminasi (Oyebanji *et al.*, 2009). Oleh karena itu, sterilisasi permukaan dilakukan dengan merendam eksplan dalam larutan disinfektan dengan konsentrasi tertentu selama periode tertentu menjadi sangat penting pada fase ini dan harus dilakukan secara tepat untuk mendukung pertumbuhan eksplan. Sterilan, atau disinfektan, yang paling umum digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan adalah *hydrogen peroxide* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Schulz *et al.*, 1993). Tujuan Penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada sterilisasi biji kepel (*Stelechocarpus burahol*) secara kultur *in vitro* dan mendapatkan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang paling tepat untuk sterilisasi biji kepel (*Stelechocarpus burahol*) secara kultur *in vitro*.

## **METODE PENELITIAN**

### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In Vitro* Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pada bulan Juli – November 2018

### **B. Bahan dan Alat penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa bahan tanam berupa biji kepel, medium dasar MS, 2,4-D, BAP, alkohol 96%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fungisida Dithane, bakterisida Agrept, larutan detergen, agar, gula pasir, KOH, HCL, plastik wrap dan aquadest steril.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas: Autoklaf, *Laminar Air Flow*, kompor gas, glassware (gelas ukur, erlenmeyer, botol kultur, gelas beaker), botol jam, pinset, sprayer, timbangan analitik, rak kultur, pengaduk, aluminium foil, kertas payung, gunting, lampu bunsen, pH stik, hand sprayer pipet, mistar, dan alat tulis.

### **C. Metode Penelitian**

Penelitian dilakukan menggunakan metode eksperimen faktor tunggal dengan 6 perlakuan. Masing- masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 18 unit. Setiap unit terdiri dari 3 sampel sehingga total keseluruhan terdapat 54 eksplan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang dicobakan yaitu sterilisasi eksplan dengan perendaman biji kepel dalam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada berbagai konsentrasi dan lama perendaman:

1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 5 menit
2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 15 menit
3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 5 menit
4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 15 menit
5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 5 menit
6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 15 menit

### **D. Tata Laksana Penelitian**

#### **1. Sterilisasi Alat**

##### **a. Sterilisasi Basah**

Sterilisasi basah dilakukan dengan cara memasukan alat yang telah dibungkus kertas pada autoklaf selama 2 jam dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C.

##### **b. Sterilisasi Bakar**

Sterilisasi bakar dilakukan di dalam LAF pada saat alat akan digunakan untuk inokulasi.

##### **c. Sterilisasi UV**

Sterilisasi UV dilakukan dengan cara enyalakan lampu UV selama 1 jam, setelah satu jam lampu UV dimatikan dan menyalakan lampu TL serta blower.

#### **2. Pembuatan Larutan Stok**

Larutan stok terlebih dahulu dibuat untuk mempermudah dalam pembuatan medium MS. Pembuatan larutan stok medium MS dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a. Larutan Stok Makro
- b. Larutan Stok Mikro

- c. Larutan Stok Vitamin
- d. Larutan Mio-Inositol
- e. Larutan Stok 2,4-D
- f. Larutan Stok BAP

### 3. Proses Pembuatan Medium MS

Medium MS yang diperlukan untuk 60 botol dan tiap botol berisi 20 ml medium adalah  $60 \times 20 \text{ ml} = 1200 \text{ ml}$  untuk 6 perlakuan. Medium MS sebanyak 1200 ml dibuat dengan dibagi menjadi 3 erlenmeyer dimana masing-masing erlenmeyer memuat sebanyak 400 ml media MS. Media MS dipanaskan hingga mendidih kemudian dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing sebanyak 20 ml dan ditutup dengan plastik dan diikat karet. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1 atm selama 120 menit. Setelah selesai medium disimpan sementara di ruang inkubasi.

### 4. Sterilisasi eksplan

#### a. Persiapan eksplan

Persiapan eksplan dilakukan dengan cara memilih buah yang telah matang dan memisahkan biji dari daging buah. Kemudian biji dicuci dan dibersihkan dari pulpnya hingga keset. Setelah itu, biji kepel diampelas sampai terlihat bagian berwarna putih. Biji kepel diampelas pada bagian atas biji kepel yang dekat dengan embrio dan salah satu sisi bagian biji kepel.

#### b. Tata laksana sterilisasi eksplan

Eksplan biji kepel yang telah bersih direndam dengan larutan deterjen 2 g/l selama 10 menit. Setelah itu, biji kepel dibilas dengan air mengalir. Sterilisasi selanjutnya, biji kepel direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida 2g/l selama 3 jam dan dishaker, setelah itu dibilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali didalam LAF. Kemudian biji kepel direndam dalam alkohol 96% selama 1 menit. Setelah itu biji kepel disterilisasi dengan cara direndam dalam  $\text{H}_2\text{O}_2$  sesuai dengan perlakuan yang digunakan yaitu  $\text{H}_2\text{O}_2$  5% selama 5 menit,  $\text{H}_2\text{O}_2$  5% selama 15 menit,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10% selama 5 menit,  $\text{H}_2\text{O}_2$  10% selama 15 menit,  $\text{H}_2\text{O}_2$  15% selama 5 menit, dan  $\text{H}_2\text{O}_2$  15% selama 15 menit, kemudian dibilas dengan menggunakan aquadest steril. Biji kepel yang telah steril diinokulasikan pada medium MS. Tahap sterilisasi dan penanaman eksplan dilakukan didalam LAF.

### 5. Inokulasi eksplan

Penanaman dilakukan dengan cara eksplan yang telah steril di dalam botol jam sesuai perlakuan yang diujikan. Eksplan yang telah steril kemudian ambil menggunakan pinset yang telah steril, lalu bagian eksplan yang tidak di ampelas dibakar terlebih dahulu di atas api lampu bunsen. Kemudian eksplan ditanam dalam medium MS+ BAP 0,5ppm + 2,4 D 2ppm dengan penanaman 1 eksplan pada setiap botol. Eksplan yang telah ditanam, kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil*, kemudian diikat karet dan bagian mulutnya dibungkus dengan plastik wrap.

### 6. Inkubasi

Proses inkubasi dimulai dengan mensterilkan rak-rak inkubasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dan dilap dengan kain bersih. Suhu ruang inkubasi kultur  $23^{\circ}\text{C}$  dan kelembaban sekitar 70% serta pencahayaan menggunakan lampu TL (neon) 40 watt selama 24 jam setiap harinya. Botol-

botol diletakkan secara acak kemudian diamati pertumbuhannya sesuai dengan parameter pengamatan.

#### E. Parameter yang Diamati

1. **Persentase Hidup (%)**

$$\% \text{Hidup} = \frac{\sum \text{Eksplan hidup}}{\sum \text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

2. **Persentase Browning (%)**

$$\% \text{Browning} = \frac{\sum \text{Eksplan coklat}}{\sum \text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

3. **Persentase Kontaminasi (%)**

$$\% \text{Kontaminasi} = \frac{\sum \text{Eksplan terkontaminasi}}{\sum \text{Total eksplan tiap perlakuan}} \times 100\%$$

4. **Jenis Kontaminasi**

Pengamatan parameter jenis kontaminasi dilakukan dengan cara mengamati kontaminasi pada eksplan secara visual. Kontaminan dapat berupa jamur ataupun bakteri. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai terjadinya kontaminasi.

5. **Saat Kontaminasi**

Parameter saat kontaminasi digunakan untuk menghitung kecepatan munculnya kontaminasi pada eksplan. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai terjadinya kontaminasi.

6. **Saat Browning**

Parameter saat browning digunakan untuk menghitung kecepatan munculnya browning pada eksplan. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai terjadinya browning.

#### F. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis deskriptif. Data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

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 60 hari, dengan variabel pengamatan berikut ini: 1) Persentase hidup; 2) Persentase *browning*; 3) Persentase kontaminasi; 4) Jenis kontaminasi; 5) Saat kontaminasi; dan 6) Saat *browning*. Hasil pengamatan optimasi sterilisasi eksplan biji kepel dapat dilihat pada tabel berikut.

Table 1. Pengaruh sterilisasi terhadap persentase hidup, persentase *browning*, persentase kontaminasi, jenis kontaminasi, saat kontaminasi, dan saat *browning* eksplan biji kepel pada 60 HST

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

### A. Persentase Hidup

Hasil dari uji sterilisasi terhadap persentase hidup eksplan biji kepel pada tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan dengan penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 15 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 5 menit, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 15 menit, telah mampu menekan kontaminasi baik jamur maupun bakteri dan memberikan persentase hidup masing-masing sebesar 100%, sedangkan perlakuan dengan penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 15 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 5 menit, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 15 menit menunjukkan persentase eksplan hidup yang tinggi akan tetapi tidak terjadi tumbuh kalus serta pada akhirnya terjadi kerusakan embrio.

Penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada konsentrasi tinggi diduga mampu meminimalisir sumber kontaminasi baik internal maupun eksternal. Selain itu penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% dengan lama perendaman 15 menit juga mampu menekan terjadinya *browning* sebesar 0%. Menurut Aris (2018), penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang cukup pekat mampu melapisi eksplan sehingga tidak terjadi proses oksidasi. Perendaman eksplan yang dilakukan selama 15 menit diduga mampu mengeluarkan senyawa fenol saat proses sterilisasi sehingga dapat mencegah terjadinya *browning*. Uji sterilisasi dengan menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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

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. Eksplan yang terkontaminasi oleh bakteri ialah pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 5 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 15 menit, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 5 menit. Kontaminasi pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 5 menit dengan persentase kontaminasi sebesar 55,56%. Pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 15 menit terjadi kontaminasi dengan persentase 77,78%, sedangkan pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 yang terdapat didalam tanaman, sehingga dapat bebas dari proses sterilisasi.

Sterilisasi pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 15 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 5 menit, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 15 menit, mampu menekan terjadinya pertumbuhan kontaminasi baik jamur maupun bakteri secara maksimal, hal ini dibuktikan dengan tingkat dari kontaminasi sebesar 0%. Hal ini berarti konsentrasi bahan sterilan berupa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 10% ke atas telah mampu mematikan jamur dan bakteri dalam eksplan. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> adalah salah satu bahan sterilan yang sering digunakan pada proses sterilisasi eksplan.

### **C. Persentase Browning**

Hasil dari pengamatan persentase browning dapat dilihat pada Tabel 1 dimana satu perlakuan mengalami *browning*. Persentase *browning* yang terjadi pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 5 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 5 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 15 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 5 menit, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% selama 15 menit masing-masing sebesar 0% atau tidak terjadi *browning*. Pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 15 menit terjadi persentase *browning* sebesar 22,22%. Tingginya 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.

### **D. Jenis Kontaminasi**

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. Kontaminasi bakteri terjadi pada 3 perlakuan yaitu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 5 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 15 menit, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 5 menit. Kontaminasi pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 5 menit dengan persentase kontaminasi sebesar 100%. Pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 15 menit terjadi kontaminasi dengan persentase 77,78%, sedangkan pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 5 menit terjadi kontaminasi dengan persentase kontaminasi sebesar 55,56%.

Persentase kontaminasi pada perlakuan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 5 menit, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% selama 15 menit, dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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. Pada perlakuan  $H_2O_2$  10% selama 15 menit,  $H_2O_2$  15% selama 5 menit, dan  $H_2O_2$  15% selama 15 menit dapat mengatasi kontaminasi baik jamur dan bakteri sehingga persentase kontaminasi sebesar 0%. Hal 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**

Hasil dari pengujian sterilisasi didapatkan eksplan yang terkontaminasi oleh bakteri pada perlakuan  $H_2O_2$  5% selama 5 menit,  $H_2O_2$  5% selama 15 menit, dan  $H_2O_2$  10% selama 5 menit. Kontaminasi pada perlakuan  $H_2O_2$  5% selama 5 menit terjadi pada hari ke 9. Pada perlakuan  $H_2O_2$  5% selama 15 menit terjadi kontaminasi pada hari ke 26, sedangkan pada perlakuan  $H_2O_2$  10% selama 5 menit terjadi kontaminasi pada hari ke 50. Semakin singkat masa perendaman serta semakin kecil konsentrasi dari larutan  $H_2O_2$  maka semakin cepat pula pertumbuhan dari kontaminan. Pada semua perlakuan mampu menekan pertumbuhan jamur namun pada perlakuan  $H_2O_2$  5% selama 5 menit,  $H_2O_2$  5% selama 15 menit, dan  $H_2O_2$  10% selama 5 menit belum mampu menekan pertumbuhan bakteri yang lebih cepat yaitu pada hari ke 9. Hal ini dikarenakan bakteri yang biasanya bersifat endogen dan sporanya berada didalam eksplan sehingga tidak cukup diatasi dengan sterilisasi permukaan. Hasil penelitian ini menunjukkan pada perlakuan  $H_2O_2$  10% selama 15 menit,  $H_2O_2$  15% selama 5 menit, dan  $H_2O_2$  15% selama 15 menit tidak terjadi kontaminasi (0%) pada eksplan selama 60 hari pengamatan. Hal ini dikarenakan konsentrasi dan lama perendaman eksplan pada bahan sterilan yang diberikan telah mampu membunuh spora yang berada di dalam eksplan dan mampu menekan pertumbuhan kontaminan. Konsentrasi  $H_2O_2$  yang digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan biasanya berkisar 3-20% tergantung pada jenis bahan tanaman yang digunakan (Martiansyah, 2013). Hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan cendawan dengan cara menghidrolisis sel atau menggumpalkan protein yang terdapat pada protoplasma. Protein yang telah menggumpal kehilangan fungsinya sehingga bakteri dan cendawan mengalami kematian (Martiansyah, 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 mengalami *browning* pada perlakuan  $H_2O_2$  5% selama 15 menit. *Browning* pada perlakuan  $H_2O_2$  5% selama 15 menit terjadi pada hari ke 11. Pada perlakuan  $H_2O_2$  10% selama 15 menit,  $H_2O_2$  15% selama 5 menit, dan  $H_2O_2$  15% selama 15 menit tidak terjadi *browning* (0%) pada eksplan selama 60 hari 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 ( $\text{Cu}^{2+}$ ) seperti polifenol oksidase dan tirosinase yang dilepaskan dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai (Hutami, 2008). 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). 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.

### KESIMPULAN

1. Sterilisasi menggunakan larutan  $\text{H}_2\text{O}_2$  dapat menghambat terjadinya kontaminasi pada kultur *in vitro* biji kepel.
2. Sterilisasi dengan perendaman menggunakan  $\text{H}_2\text{O}_2$  10% selama 15 menit merupakan metode sterilisasi paling efektif dalam sterilisasi dan menghasilkan eksplan hidup sebesar 100% selama 8 minggu pada kultur *in vitro* biji kepel.

### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai induksi kalus pada eksplan biji kepel pada berbagai konsentrasi zat pengatur tumbuh.

### DAFTAR PUSTAKA

- Aris, Irfan. 2018. Pengaruh Penggunaan Hidroen Peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Pada Sterilisasi Endosperm Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F.& Th.). Skripsi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Fahmadi, A. 2006. Induksi Tunas Aksiler Secara In Vitro, Optimasi Sterilisasi dan Induksi Tunas Jarak Pagar (*Jatropha curcas* LINN) Secara In Vitro. Skripsi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Tidak dipublikasikan.
- Farooq, S. A. Farooq T. T dan Rao, T. V. 2002. Micropropagation of *Annona squamosa* L. Using Nodal Explants. Pakistan Journal of Biological Sciences 5 (1): 43-46. <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=pjbs.2002.43.46>. Diakses pada 25 Januari 2019.
- Gunawan, L. W., 1992. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Pusat Antar Universitas. IPB. Bogor.
- Hatmi, R. U., dan Widyayanti, S. 2014. Potensi kepel (*Stelechocarpus burahol* [Blume] Hook.F & Th. Sebagai Sumber Pangan Fungsional. Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Genetik Pertanian (22) : 248–257.
- Hutami, Sri. 2008 . Masalah Pencoklatan Pada Kultur Jaringan. Jurnal AgroBiogen 4(2):83-88. [http://biogen.litbang.pertanian.go.id/terbitan/pdf/agrobiogen\\_4\\_2\\_2008\\_83.pdf](http://biogen.litbang.pertanian.go.id/terbitan/pdf/agrobiogen_4_2_2008_83.pdf). Diakses pada 25 Januari 2019.
- Mariska, Ika dan D. Sukmadjaja. 2003. Perbanyak Bibit Abaka Melalui Kultur Jaringan. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. [http://biogen.litbang.pertanian.go.id/terbitan/pdf/Buku\\_Abaka.pdf](http://biogen.litbang.pertanian.go.id/terbitan/pdf/Buku_Abaka.pdf). Diakses 02 Februari 2019.

- Martiansyah I, Deden D. E., Nurhaimi H. & Darmono T. 2013. Optimasi Prosedur Sterilisasi Permukaan Eksplan Stek Mikro Karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). Menara Perkebunan 2013 81(1), 9-14.
- Oyebanji, O.B., Nweke O., Odebunmi O., Galadima N.B., Idris M.S., Nnodi U.N., Afolabi A.S., Oghadu G.H. 2009. Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice, and sorghum seeds. African Journal of Biotechnology 8(20):53955399.
- Rineksane I. A. 2015. Regenerasi Anggrek Vanda tricolor Pasca Erupsi Merapi melalui Kultur In Vitro. Seminar Nasional Universitas PGRI Yogyakarta. [http://repository.upy.ac.id/428/1/1P13\\_Innaka%20Ageng%20378-384.pdf](http://repository.upy.ac.id/428/1/1P13_Innaka%20Ageng%20378-384.pdf). Diakses 25 Januari 2019.
- Rismayani, Hamzah F. 2010. Pengaruh pemberian chlorox (NaOCl) pada sterilisasi permukaan untuk perkembangan bibit aglaonema (*Donna carmen*) secara *in vitro*. Prosiding Seminar Ilmiah dan Pertemuan Tahunan PGJ dan PEJ XX. Sulawesi Selatan. <https://drive.google.com/file/d/0B3AKw1y0LHD9bjZ4YTAtZTBhMmM/view>. Diakses 10 Maret 2019.
- Santoso, U. Dan F. Nursandi. 2004. Kultur Jaringan Tanaman. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang
- Schulz B; Wanke U; Draeger S; Aust HJ. 1993. Endophytes from herbaceous plant and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. Mycol Res 97: 1447-1450.
- Srivastava N, B Kamal, V Sharma, YK Negi, AK Dobriyal, S Gupta & VS Jadon. 2010. Standardization of sterilization protocol for micro-propagation of *Aconitum heterophyllum* an endangered medicinal herb. Acad Arena 2 (6), 62-66.
- Sulistiyo, R. C., Z. Luthfiyyah, B. Susilo, L. N. Dalimartha, E.C. Wiguna, N. Yuliana, dan E.N. Prasetyo. 2017. Pengaruh Teknik Sterilisasi dan Komposisi Medium Terhadap Pertumbuhan Tunas Eksplan Sirsak Ratu. <https://jurnal.uns.ac.id/bioedukasi/article/download/19726/pdf>. Diakses 02 Februari 2019.
- Visca Riana Sari. 2012. Variasi Morfologi Tanaman Kepel (*Stelechocarpus burahol Hook.F dan Thomson*) Yang Tumbuh Pada Ketinggian Berbeda. <http://repository.unair.ac.id/25681/1/SARI%2C%20VISCA%20R.pdf>. Diakses 22 Februari 2018.or
- Wahyuni, Sri. 2018. Pengaruh Jenis Media Dan Konsentrasi Thidiazuron Terhadap Pertumbuhan PLB (Protocorm Like Bodies) Anggrek Vanda Tricolor Secara In Vitro. <http://repository.umy.ac.id/handle/123456789/20701>. Diakses 10 Maret 2019