

I. TINJAUAN PUSTAKA

A. Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F. & Th.)

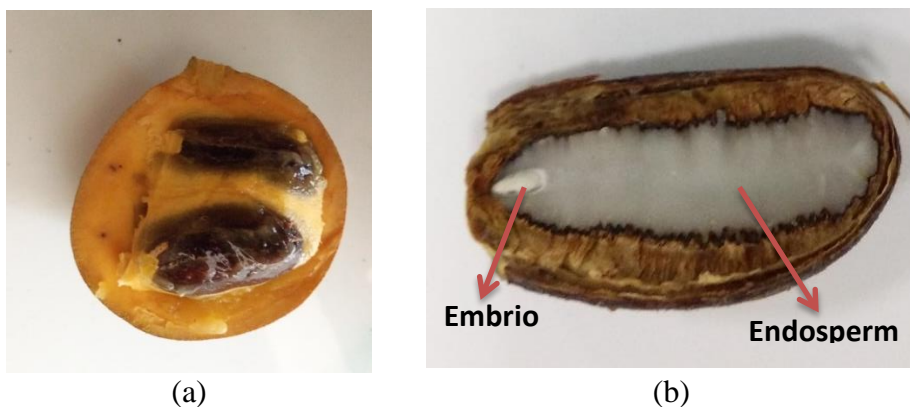
Kepel merupakan tanaman buah asli Indonesia. Dalam taksonominya, kepel masuk ke dalam kelas magnoliopsida, famili annonaceae dan genus *Stelechocarpus* serta memiliki nama species *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F. & Th. (Yuwono, 2015).

Pohon kepel memiliki tinggi hingga mencapai 25 meter. Daunnya berwarna merah saat muda dan berubah menjadi hijau tua saat tua. Daun berbentuk lanset (bulat telur), tidak berbulu, dan merotal tipis dengan panjang pangkal daun mencapai 1,5 cm. Tajuk atau kanopinya berbentuk kubah meruncing (Gambar 1). Bunga kepel muncul pada tonjolan-tonjolan batang merupakan bunga yang berkelamin tunggal. Bunga jantan terletak di batang atas dan di percabangan yang lebih tua berkoloni 8 - 16 kuntum dengan diameter 1 cm, sedangkan bunga betina kepel hanya berada di pangkal batang dengan diameter mencapai 3 cm. Buah kepel bergerombol antara 1 - 13 buah (Gambar 1). Panjang tangkai buah mencapai 8 cm. Buah yang matang berbentuk bulat berbenjol, berwarna kecoklatan, berdiameter 5-6 cm, dan berisi sari buah yang dapat dimakan. Berat segar buah antara 62-105 gram dengan bagian yang dapat dimakan sebanyak 49% sedangkan bijinya 27% dari berat buah segar (Yuwono, 2015).



Gambar 1. Pohon kepel (Dokumentasi pribadi, 2018).

Buah kepel dianggap matang bila digores kulit buahnya terlihat berwarna kuning atau coklat muda. Biji kepel berbentuk menjorong, berukuran besar, berwarna coklat tua kehitaman dan dalam satu buah terdapat 2-8 biji (Gambar 2a). Biji kepel tergolong buah batu (*stony seed*) karena berkulit keras menyerupai tempurung dengan permukaan luar kasar berlekuk, berwarna coklat atau kehitaman dan keras. Kulit biji yang keras berfungsi untuk melindungi embrio dan kotiledon yang terletak di dalam biji (Gambar 2b) (Putri *et al.*, 2011).



Gambar 2. Biji kepel a) Biji kepel dalam buah b) Biji kepel yang dibelah (Dokumentasi pribadi, 2018).

Budidaya tanaman kepel umumnya dilakukan secara generatif. Perbanyakan tanaman kepel menggunakan bahan tanam biji membutuhkan waktu persemaian yang lama karena biji sulit untuk berkecambah, sehingga populasi tanaman tersebut terbatas. Biji kepel memiliki masa dormansi yang lama sekitar 4 – 6 bulan untuk berkecambah secara alami. Hal tersebut karena biji kepel memiliki tekstur keras pada bagian kulit dan endospermnya (Isnaeni dan Habibah, 2014). Maka dari itu, perlu dilakukan perbanyakan tanaman kepel secara *in vitro* menggunakan embrio dan endosperm untuk mempercepat pertumbuhan dan mendapatkan jumlah tanaman yang banyak.

B. Kultur *In Vitro*

Menurut Santoso dan Nursandi (2002) kultur *in vitro* merupakan teknik budidaya sel, jaringan dan organ tanaman dalam suatu lingkungan yang terkendali dan dalam keadaan aseptis atau bebas mikroorganisme. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Suratman dkk., (2013) yang menjelaskan bahwa kultur *in vitro* merupakan suatu metode untuk menumbuhkan suatu tanaman utuh secara aseptis dengan mengisolasi dari sebagian jaringan tanaman seperti daun, tunas, bunga, biji, endosperm, embrio dan lainnya.

Perbanyakan secara *in vitro* dapat menghasilkan bibit baru yang sifatnya seperti induknya, karena termasuk dalam perbanyakan vegetatif. Selain itu bibit yang dihasilkan bebas dari penyakit yang disebabkan oleh bakteri dan jamur karena dilakukan secara aseptis. Keuntungan yang didapatkan antara lain : waktu perbanyakan cepat, menghindari sterilitas yang menghambat hibridasi, bebas patogen dan sebagai pelestarian plasma nutfah (Putra, 2017).

Perbanyakan secara *in vitro* menggunakan medium sebagai tempat pertumbuhan eksplan dalam botol kultur. Beberapa medium yang digunakan yaitu medium *Vacient Went* (VW), Medium *Murashige and Skoog* (MS) dan *New Dogashima Medium* (NDM). Medium yang sering digunakan untuk perbanyakan secara *in vitro* menggunakan medium *Murashige and Skoog* (MS) (Putra, 2017).

Medium *Murashige and Skoog* (MS) merupakan medium yang dibuat oleh Murashige dan Skoog pada tahun 1962 untuk medium optimalisasi pertumbuhan kalus tembakau. Formulasi medium MS campuran dari nutrisi anorganik, garam, vitamin dan asam amino. Medium MS mengandung semua unsur makro esensial dan unsur mikro. Kalium hidrogen fosfat berfungsi sebagai sumber fosfat, sedangkan unsur mikro seperti Boron, Mangan, Molibdenum, Tembaga dan Zink memiliki peran vital dalam metabolisme tanaman. Boron berperan utama dalam metabolisme karbohidrat. Tiamin, Asam nikotinat, Piridoxin dan Inositol berperan sebagai kofaktor enzimatik metabolisme primer dan sekunder tanaman, sedangkan glisin berfungsi sebagai sumber asam amino (Himedia, 2017)

Menurut Marlina (2004) medium *Murashige and Skoog* (MS) sering digunakan dalam kultur *in vitro* karena memenuhi unsur hara makro, mikro dan vitamin untuk pertumbuhan tanaman. Komponen medium MS untuk unsur hara makro yaitu: Ammonium nitrat (NH_4NO_3 , KNO_3), Kalsium klorida dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Magnesium sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) dan Kalium hidrogen fosfat (KH_2PO_4). Komponen unsur hara mikro yaitu : Kalium Iodida (KI), Asam borat (H_3BO_3), Mangan II sulfat tetrahidrat ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Zink sulfat heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), $\text{NaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Cuppri II sulfat pentahidrat

($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), Cobalt II klorida ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), Disodium etilen diaminat tetraasetat (Na_2EDTA) dan Ferri II sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Sedangkan komponen vitamin yaitu: Thiamin HCl, Asam nikotinat, Piridoxin HCl dan Glisin serta Mio-Inositol. Medium MS sebagai medium dasar ditambahkan glukosa dan penambahan bahan pematat berupa agar.

Metode kultur *in vitro* membutuhkan zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk mengontrol organogenesis dan morfogenesis dalam pembentukan tunas, akar dan kalus, sehingga dapat mempercepat pertumbuhan eksplan tanaman (Rahmawati dkk., 2014). ZPT pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. ZPT dapat dibagi menjadi beberapa golongan yaitu golongan auksin, sitokinin, giberelin dan inhibitor. ZPT yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* yaitu auksin dan sitokinin. Kultur *in vitro* endosperm pada tanaman dikotil pada medium perlu ditambah hormone auksin dan sitokinin. Salah satu zat pengatur tumbuh yang digolongkan auksin yaitu 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D). Auksin berperan dalam merangsang pembelahan dan perbesaran sel yang terdapat pada pucuk tanaman dan menyebabkan pertumbuhan pucuk baru. Penambahan 2,4-D dalam jumlah yang lebih stabil cenderung menyebabkan terjadinya pertumbuhan kalus dari eksplan dan menghambat regenerasi pucuk tanaman. Sitokinin merupakan hormon yang dapat meningkatkan pembelahan sel pada jaringan tanaman serta mengatur pertumbuhan dan perkembangan tanaman serta pertumbuhan tunas (Andaryani, 2010). Jenis sitokinin yang paling aktif yaitu 6-*benzylamino purine* (BAP) karena tidak mudah terdegradasi (Sukamto, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian Mahadi, dkk. (2016) penambahan ZPT 2,4-D 2 mg/l dan BAP 0,5 mg/l pada medium MS untuk induksi kalus menggunakan eksplan biji jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) waktu tumbuh kalus 6 hari setelah inokulasi dengan pertumbuhan kalus 100%. Tekstur kalus yang dihasilkan remah dan berwarna kehijauan karena mengandung klorofil serta mendapatkan respon terbaik terhadap kalus yang dikulturkan.

C. Embrio dan Endosperm

Endosperm adalah jaringan triploid yang terdapat dalam biji. Endosperm merupakan massa sel parenkim yang homogen tanpa jaringan pembuluh, pemisahan kromosom, poliploidin dan pembelahan. Endosperm yang terdapat pada individu tanaman lebih dari 81% pada tumbuhan berbunga. Endosperm berfungsi untuk memelihara embrio selama pertumbuhan pada fase heterofit dan menjadi sumber cadangan makanan selama pertumbuhan embrio dan perkecambahan biji. Jaringan endosperm dapat dikonsumsi seluruhnya oleh embrio ketika biji menua. Biji tumbuhan tersebut disebut non endosperma, tetapi apabila jaringan endosperm tetap ada ketika biji menjadi tua sebagai makanan cadangan dalam bentuk tepung, lemak atau protein. Kultur endosperma secara *in vitro* bertujuan untuk mendapatkan tanaman triploid karena endosperma adalah jaringan triploid (Sukanto, 2010).

Faktor keberhasilan kultur *in vitro* dengan eksplan endosperm antara lain umur endosperm, penyertaan embrio, pencoklatan (*browning*) dan umur kultur. Menurut Tao *et al.*, (2009), umur endosperm pada umumnya dalam keadaan fase kritis terhadap respon pertumbuhan secara *in vitro*. Ekspalan endosperm yang

umurnya terlalu muda atau telah melalui fase meristematis tidak respon apabila dikulturkan. Apabila endosperm muda masih pada fase meristematis dapat respon bila dikulturkan.

Kultur embrio merupakan pengambilan embrio dari biji dan mengecambahkan dalam kondisi aseptik. Kultur embrio dapat dilakukan untuk mengatasi sterilitas dan dormansi biji (Ambarita, 2013). Selain itu, penggunaan embrio untuk membentuk embriogenesis somatik karena jaringan embrio merupakan jaringan meristemik. Embriogenesis somatik merupakan salah satu teknik perbanyakan bibit bermutu dengan jumlah yang banyak. Embriogenesis somatik merupakan suatu proses perkembangan sel somatik membentuk tumbuhan baru melalui tahap perkembangan embrio yang spesifik tanpa melalui fusi gamet. Embriogenesis somatik memiliki struktur bipolar yang memiliki dua calon meristem akar dan tunas. Perkembangan embriogenesis somatik sama dengan embrio zigotik yaitu dimulai dari fase globular, hati, torpedo dan planlet (Purnamaningsih, 2002).

Penyertaan embrio untuk eksplan dapat mempercepat pertumbuhan tunas dalam kultur *in vitro*. Eksplan dengan embrio atau hanya endosperm tidak berpengaruh signifikan terhadap pertumbuhan kalus atau tunas. Pencoklatan atau *browning* yang terjadi pada eksplan yang mengalami pencoklatan atau menjadi hitam dihubungkan dengan kegagalan eksplan atau mati. Senyawa *fenolik* yang teroksidasi sering keluar dan masuk dalam media melalui luka pada jaringan eksplan sehingga menyebabkan pencoklatan pada eksplan. Terjadinya pencoklatan tidak selalu menandakan eksplan mati, tetapi eksplan masih dapat

tumbuh walaupun mengalami pencoklata berat. Umur kultur merupakan salah satu faktor keberhasilan dalam kultur *in vitro*. Semakin tua umur kultur, sel-sel dalam kalus meningkat ploidinya dan dapat kehilangan potensi regenerasinya. Kapasitas regenerasi berbeda-beda pada setiap jenis tanaman. Kehilangan totipotensi berhubungan dengan terjadinya pembelahan nucleus abnormal, penggandaan kromosom dan berbagai jenis mitosis yang tidak beraturan (Sukamto, 2010). Salah satu keberhasilan perbanyakan kultur *in vitro* dipengaruhi oleh tingkat kesterilan eksplan.

D. Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi merupakan suatu proses menghilangkan atau mematikan mikroorganisme dari suatu bahan yang disterilkan. Sterilisasi merupakan tahap awal yang dilakukan dalam kultur *in vitro*. Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang terbawa pada eksplan yang menjadi penghambat pertumbuhan eksplan menjadi tanaman utuh. Sterilisasi dilakukan terhadap alat, bahan dan ruangan yang akan digunakan pada tahap awal kultur *in vitro* (Suratman dkk., 2013). Kontaminasi eksplan merupakan hubungan antara tanaman dengan faktor lingkungan pada saat pengambilan eksplan. Berbagai bahan sterilan yang digunakan untuk mendekontaminasi organ atau jaringan terutama bakteri dan cendawan. Akan tetapi bahan sterilan juga dapat berdampak racun pada eksplan. Konsentrasi sterilan, waktu eksplan terpapar sterilan dan urutan penggunaan diupayakan untuk meminimalisir kerusakan eksplan (Roviq dan Wardiyati, 2011).

Menurut Siswanto (2006), sterilisasi bakar digunakan untuk mensterilkan *dissecting kits* dengan cara dibakar di api bunsen sebanyak tiga kali. Cara ini biasanya digunakan untuk jenis eksplan yang keras atau berdaging seperti : tebu, biji salak, buah anggrek dan jenis umbi-umbian. Sterilisasi kimia merupakan sterilisasi dengan menggunakan bahan kimia. Sterilisasi cara ini biasanya digunakan untuk jenis eksplan yang lunak, seperti : daun, tangaki lunak, tunas dan anther. Menurut Nurfauziah (2004), sterilisasi eksplan yang baik dengan cara direndam dengan antibiotik (*ampicillin*) 100 mg/l selama 60 menit dan NaOCl 10% selama 5 menit kemudian dibilas dengan aquades steril. Menurut Naraswamy (2002) menjelaskan bahwa sterilisasi eksplan hanya dengan pencucian air yang mengalir kemudian direndam dalam larutan Sodium hipoclorite (NaOCl) 2% atau Kalsium hipoklorit (CaOCl) bersama deterjen 0.05%, kemudian eksplan dicelupkan pada alkoho beberapa detik untuk dekontaminan. Bahan sterilian berdasarkan penggunaannya terdiri dari desinfektan dan antiseptik. Salah satu desinfektan yang sering digunakan yaitu sodium hipoklorit (NaOCl).

E. Sodium Hipoklorit (NaOCl)

Sodium hipoklorit atau Natrium hipoklorit (NaOCl) memiliki nama lain clorox atau sunklin. NaOCl adalah salah satu bahan kimia yang dapat berfungsi sebagai desinfektan karena dapat melepaskan klorin yang mampu membunuh mikroorganisme. NaOCl termasuk golongan halogen yang teroksigenasi. Larutan ini merupakan desinfektan derajat tinggi karena sangat aktif pada bakteri, virus, jamur, parasit dan beberapa spora. Hipoklorit diketahui sebagai antibakteri yang sangat efektif walaupun dalam konsentrasi yang sangat sedikit (Singh *et al.*,

2011). NaOCl dapat mengendalikan infeksi dan tidak menimbulkan dampak negatif terhadap eksplan dalam waktu yang lama. NaOCl banyak digunakan sebagai desinfektan dalam embriogenetik somatik (Badoni dan Chauhan, 2010).

NaOCl merupakan salah satu zat aktif yang jika dilarutkan dalam air akan menimbulkan efek *bleaching* karena dapat melepaskan ion klorida ke dalam larutan dan juga efektif digunakan untuk desinfektan. Keberadaan soda kaustik dalam NaOCl menyebabkan pH air meningkat, ketika NaOCl larut dalam air, dua zat akan terbentuk yaitu asam hipoklorit (HOCl) dan ion hipoklorit (OCl). Asam hipoklorit (HOCl) kemudian terdegradasi membentuk asam klorida dan oksigen. Oksigen merupakan oksidator yang sangat kuat, oleh karena itu, NaOCl sering digunakan untuk membunuh bakteri, virus, dan jamur. NaOCl bersifat hipertonis menyebabkan sel teroksidasi dan terhidrolasi secara osmosis mengalirkan air keluar dari sel. Jaringan nekrotik dan pus terlarutkan dan efek antimikrobanya mampu masuk lebih dalam dan membersihkan mikroba dalam eksplan. HOCl dan substansi yang terdapat pada larutan NaOCl ketika berkontak dengan jaringan organik dapat bertindak sebagai pelarut yang melepas klorin yang membentuk kloramin (reaksi kloraminasi). HOCl dan OCl menyebabkan penurunan asam amino dan terjadinya hidrolisis pada sel. Reaksi kloraminasi antara klorin dan group amino (NH) membentuk kloramin yang mempengaruhi metabolisme sel. Klorin (oksidator kuat) menghasilkan efek anti mikroba dengan menghambat enzim-enzim bakteri menyebabkan oksidasi yang ireversibel dari enzim esensial yang terdapat pada bakteri (Permatasari, 2013).

Meurut Raviq dan Wardiyati (2011), sterilisasi eksplan bunga manga (*Mangifera indica* L.) menggunakan larutan NaOCl 5% selama 5 menit efektif sebagai desinfektan. Sementara itu, NaOCl 5 dan 10% selama 5 dan 10 menit juga digunakan oleh Rineksane (2013) sebagai bahan sterilan biji manggis (*Gracinea mangostene*) untuk pertumbuhan kalus embrio somatik manggis. Sedangkan Maldonado, *et al.* (2013) NaOCl 1% digunakan untuk sterilisasi biji srikaya (*Annona squamosal* L.). Sowa and Fegas (2011) menggunakan NaOCl 4,85% selama 7 menit untuk sterilisasi biji bunga silpium (*Silphium perfoliatum* L.)

Metode sterilisasi pada biji, embrio maupun endosperm kepel yang tepat untuk kultur *in vitro* hingga saat ini belum diketahui. Berdasarkan hasil penelitian Rineksane *et al.*, (2012) bahwa perkembangan embriogenik biji manggis (*Garcinia mangostana* L.) sterilisasi biji dilakukan dengan cara membersihkan biji dari daging buahnya, kemudian dicuci dengan air mengalir. Biji manggis kemudian direndam dalam larutan deterjen 2 g/l selama 5 menit. Biji kemudian direndam dalam larutan bynomil 5 g/l selama 3 jam, kemudian dibilas dengan aquades steril 3 kali. Biji kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu biji terlapisi dan tanpa lapisan. Biji kemudian disterilkan dengan larutan NaOCl 5% dan 10% selama 5 menit dan 10 menit. Hasil penelitian tersebut yaitu biji tanpa lapisan memiliki tingkat kontaminasi yang rendah sebesar 9,72% dibanding dengan biji terlapisi 25%. Selain itu biji tanpa lapisan merupakan perlakuan terbaik dengan tingkat *browning* terendah.

Hasil penelitian Maldonado *et al.* (2013) pada kultur biji srikaya (*Annona squamosa* L.) menggunakan biji dari buah yang sudah masak. Sterilisasi optimal

biji srikaya dilakukan dengan cara biji srikaya dibersihkan dari daging buah dan dicuci menggunakan air mengalir. Kemudian biji dikeringkan menggunakan handuk. Biji yang telah kering kemudian direndam pada larutan NaOCl 1% selama 9 menit. Setelah itu biji dicuci dengan alkohol 96% kemudian dicuci tiga kali dengan aquades steril. Pada penelitian Nair *et al.*, (1985) kultur endosperm srikaya (*Annona squamosa* Linn) dengan menggunakan biji srikaya tua dilakukan dengan cara biji dicuci dengan air kran kemudian direndam dalam larutan Tween-20 0,1% selama satu menit. Biji selanjutnya dicuci menggunakan deterjan dan aquades. Kemudian benih disterilkan menggunakan larutan merkuri klorida 0,2 % selama 20 menit dibawah vakum kemudian dibilas hingga bersih menggunakan aquades steril. Biji berkecambah pada umur 25 hari. Kultur endosperm tersebut bertujuan untuk mendapatkan tanaman tripod atau buah tanpa biji. Bahan sterilan merkuri klorida bersifat toksik dan karsinogenik terhadap makhluk hidup, sehingga perlu diganti dengan bahan sterilan yang lebih aman seperti sodium hipoklorit.

F. Hipotesis

Penggunaan larutan NaOCl 5% selama 10 menit diduga menjadi metode paling tepat untuk sterilisasi endosperm atau embrio kepel.