

I. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi merupakan langkah awal untuk keberhasilan dalam kultur *in vitro*. Bahan eksplan dari lapangan mengandung kotoran, debu dan berbagai sumber kontaminan, sehingga perlu dilakukan sterilisasi eksplan. Sterilisasi eksplan syarat untuk kondisi aseptik (Budiarti, 2017).

Optimasi sterilisasi merupakan suatu usaha untuk mendapatkan metode sterilisasi yang terbaik pada eksplan dengan mencegah terjadinya kontaminasi dan *browning* dalam kultur *in vitro*. Kontaminasi pada eksplan dapat menghambat pertumbuhan hingga eksplan mati yang disebabkan oleh bakteri atau jamur. Kontaminan tersebut menyebabkan persaingan mendapatkan nutrisi antara eksplan dengan mikroorganisme, sehingga pertumbuhan eksplan terganggu. (Hamzah, 2012).

A. Optimasi Sterilisasi

Optimasi sterilisasi bertujuan untuk menentukan metode sterilisasi yang optimal pada eksplan embrio dan endosperm kepel secara kultur *in vitro*. Parameter yang digunakan pada optimasi sterilisasi yaitu persentase eksplan hidup, kontaminasi dan *browning*. Parameter tersebut merupakan parameter yang saling berkaitan dan menjadi acuan terhadap keberhasilan sterilisasi suatu eksplan. Persentase eksplan hidup menunjukkan kemampuan eksplan untuk tumbuh dalam suatu medium. Menurut Daulay (2005), eksplan dapat dikategorikan hidup apabila eksplan tidak mengalami kontaminasi dan *browning*. Ahmad (2014) menjelaskan bahwa kontaminasi dapat disebabkan oleh bakteri dan jamur yang terbawa

eksplan, sementara Hutami (2008) melaporkan bahwa pencoklatan atau *browning* merupakan kondisi yang sering terjadi pada eksplan kultur *in vitro* yang dapat menghambat pertumbuhan dan kematian jaringan.

Data hasil pengamatan pada parameter persentase eksplan hidup, *browning* dan kontaminasi dianalisis menggunakan *Analisis of Variance* (ANOVA) dengan jenjang nyata $\alpha = 5\%$. Apabila terdapat beda nyata dilakukan uji lanjut DMRT dengan taraf $\alpha = 5\%$. Data hasil pengamatan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Pengaruh jenis eksplan dan metode sterilisasi terhadap persentase eksplan hidup, kontaminasi dan *browning* kepel pada 60 HST.

Perlakuan	Persentase Eksplan (%)		
	Hidup	Kontaminasi	<i>Browning</i>
EN 5% - 5'	11,11c	0	88,89c
EN 5% - 10'	44,45bc	0	55,55cb
EN 10% - 5'	66,67ab	0	33,33ba
EN 10% - 10'	100,00a	0	0,00a
EM 5% - 5'	33,33bc	0	66,67cb
EM 5% - 10'	22,22c	0	77,78c
EM 10% - 5'	88,89a	0	11,11a
EM 10% - 10'	100,00a	0	0,00a

Keterangan : - Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji lanjut DMRT dengan taraf $\alpha = 5\%$.

EN 5%-5' = Endosperm → NaOCl 5% selama 5 menit

EN 5%-10' = Endosperm → NaOCl 5% selama 10 menit

EN 10%-5' = Endosperm → NaOCl 10% selama 5 menit

EN 10%-10' = Endosperm → NaOCl 10% selama 10 menit

EM 5%-5' = Embrio → NaOCl 5% selama 5 menit

EM 5%-10' = Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit

EM 10%-5' = Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit

EM 10%-10' = Embrio → NaOCl 10% selama 10 menit

1. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui kemampuan eksplan untuk dapat tumbuh setelah disterilisasi dalam kultur *in vitro*. Eksplan dikategorikan hidup apabila eksplan tidak

mengalami *browning* dan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur maupun bakteri (Daulay, 2005).

Hasil sidik ragam pada persentase eksplan hidup dengan taraf kesalahan 5% (Tabel 2 dan Lampiran 7a) menunjukkan bahwa terdapat beda nyata antar perlakuan. Hal ini menunjukkan sterilisasi eksplan embrio dan endosperm kepel dengan berbagai konsentrasi NaOCl memberikan pengaruh nyata terhadap persentase eksplan hidup pada hari ke-60 setelah tanam.

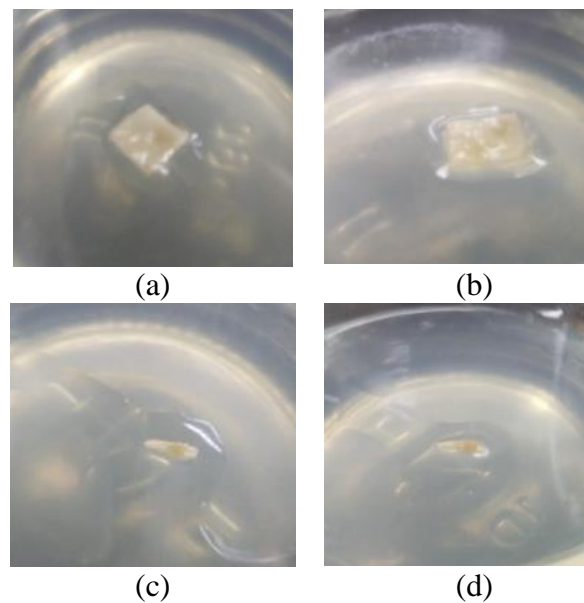
Berdasarkan hasil pengamatan (Tabel 2), perlakuan eksplan endosperm yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 10 menit dan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 10 menit memperoleh persentase eksplan hidup tertinggi (100%). Hal tersebut dikarenakan eksplan embrio dan endosperm sudah dalam kondisi steril dari dalam biji. Selanjutnya, eksplan tersebut juga disterilisasi menggunakan NaOCl dengan konsentrasi 10% untuk meningkatkan kesterilan, sehingga eksplan tidak mengalami kontaminasi. Eksplan yang hidup selain tidak terkontaminasi dan *browning*, eksplan juga mengalami pertumbuhan yang ditandai munculnya kalus. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wahyuni (2018) bahwa eksplan yang hidup dapat dilihat adanya pertumbuhan eksplan. Eksplan embrio mengalami perubahan ukuran yang membesar dan munculnya kalus menunjukkan bahwa eksplan dapat menyerap unsur hara yang terdapat pada medium.

Persentase eksplan hidup terendah terdapat pada perlakuan eksplan endosperm yang disterilisasi menggunakan NaOCl 5% selama 5 menit (11,11%). Hal ini dikarenakan konsentrasi NaOCl 5% menyebabkan eksplan

mengalami *browning*. Selain itu, eksplan tersebut juga tidak mengalami pertumbuhan.

Pada penelitian ini, terdapat eksplan hidup tetapi tidak mengalami pertumbuhan atau stagnasi. Hal ini ditandai dengan tidak ada perubahan kondisi eksplan pada saat awal inokulasi hingga umur 60 HST (Gambar 3). Hal ini dikarenakan embrio dan endosperm kepel merupakan organ yang memiliki jaringan yang tipis, sehingga apabila terpapar bahan kimia dengan konsentrasi tinggi dan waktu lama bersifat racun yang dapat mematikan sel dan jaringan eksplan.

Menurut Budiarti (2017), stagnasi merupakan kondisi eksplan yang tidak mati, namun tidak terjadi pertumbuhan. Stagnasi dapat terjadi pada eksplan meristematik, karena pertumbuhan eksplan tersebut berawal dari sel muda yang masih membelah. Murwani (2012) melaporkan bahwa endosperm biji sirsak (*Annona muricata*), srikaya (*Annona squamosa*) dan mulwo (*Annona reticulate*) terdiri dari selapis yang tersusun rapat berbentuk isodiametris dan berdinding tipis. Maldonado *et al.*, (2013) menambahkan bahwa embrio pada biji buah yang termasuk dalam *family Annonaceae* memiliki ukuran yang kecil dan lurus. Selain itu, embrio memiliki aksis embrionik dengan kotiledon pipih dan tipis. Eksplan stagnasi disajikan pada Gambar 3.



Gambar 1. Eksplan embrio dan endosperm mengalami stagnasi (a) eksplan endosperm umur 0 HST, (b) eksplan endosperm umur 60 HST, (c) eksplan embrio umur 0 HST, (d) eksplan embrio umur 60 HST (Dokumentasi pribadi, 2018).

Raviq dan Wardiyati (2011) menjelaskan bahwa bahan sterilan dapat bersifat racun pada eksplan. Menurut Permatasari (2013), NaOCl yang berkontak dengan jaringan organik dapat bertindak sebagai pelarut untuk hidrolisis sel, sehingga eksplan tidak akan mengalami perkembangan karena sel jaringan mati. Maka dalam konsentrasi tinggi, NaOCl dapat memberikan dampak yang negatif pada eksplan. Hal tersebut tidak sesuai dengan pernyataan Badoni dan Cauhan (2010), bahwa penggunaan NaOCl tidak akan menimbulkan dampak negatif terhadap eksplan apabila terpapar dalam waktu yang lama.

Rismayani dan Hamzah (2010) menyatakan bahwa konsentrasi NaOCl dan waktu sterilisasi yang dibutuhkan bervariasi tergantung dari jenis jaringan, ketebalan eksplan dan sumber tanamannya. Pada umumnya jaringan berkayu dan daun dengan lapisan kutikula yang tebal membutuhkan konsentrasi

NaOCl lebih tinggi dari pada daun yang relatif tipis. Hasil penelitiannya, pada sterilisasi *Aglaonema sp.* dengan konsentrasi NaOCl hingga 5% menyebabkan perkembangan eksplan terhambat. Dalam hal ini embrio dan endosperm kepel memiliki jaringan yang tipis dan lunak sehingga konsentrasi 10% selama 10 menit dapat dikatakan terlalu tinggi untuk digunakan.

2. Persentase Kontaminasi

Pengamatan eksplan terkontaminasi bertujuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan sterilisasi baik pada eksplan, alat maupun medium (Imanudin, 2016). Menurut Ermayanti (1997), sumber kontaminasi berasal dari mikroorganisme yang tumbuh pada bahan eksplan dan peralatan yang digunakan. Eksplan yang terkontaminasi dapat dilihat dari adanya bakteri maupun jamur yang tumbuh pada eksplan maupun medium.

Berdasarkan hasil pengamatan (Tabel 2), perendaman eksplan embrio dan endosperm kepel menggunakan berbagai konsentrasi larutan NaOCl tidak mengalami kontaminasi (0%). Hal ini disebabkan karena pada NaOCl konsentrasi 5% dapat menekan kontaminasi eksplan yang disebabkan oleh mikroorganisme pada proses sterilisasi. NaOCl merupakan bahan sterilan sebagai desinfektan untuk mengendalikan mikroorganisme. Selain itu, NaOCl berfungsi untuk membersihkan eksplan dari kotoran yang menempel pada saat sterilisasi.

Menurut Singh *et al.*, (2011), NaOCl merupakan desinfektan derajat tinggi yang aktif mengendalikan mikroorganisme. Permatasari (2013) menjelaskan bahwa NaOCl bersifat hipertonis yang dapat menyebabkan sel

pada mikroorganisme teroksidasi dan terhidrolasi secara osmosis yang mengalirkan air keluar dari sel. Jaringan nekrotik terlarutkan dan efek antimikrobanya mampu masuk lebih dalam dan membersihkan mikroba dalam eksplan. Asam hipoklorit (HOCl) dan ion hipoklorit (OCl) dapat menyebabkan penurunan asam amino dan mengakibatkan 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 teroksidasi dari enzim esensial yang terdapat pada bakteri. Menurut Rismayani dan Hamzah (2010), semakin sedikit konsentrasi NaOCl maka eksplan semakin rentan terhadap kontaminasi mikroorganisme, tetapi semakin tinggi konsentrasi NaOCl maka perkembangan jaringan eksplan menjadi terhambat.

Eksplan tidak terkontaminasi diduga karena eksplan embrio dan endosperm tidak berkontak langsung dengan kulit biji yang mungkin masih terdapat mikroba yang tertinggal di dalamnya. Menurut Rineksane *et al.*, (2013), lapisan biji dapat mengandung jamur atau bakteri, sehingga mengakibatkan tingginya persentase kontaminasi sebesar 25% pada eksplan biji Manggis (*Gracinia mangostana* L.) yang dilapisi dibanding dengan eksplan biji tanpa lapisan hanya 9,75%.

3. Persentase *Browning*

Pengamatan persentase eksplan *browning* untuk mengetahui adaptasi embrio dan endosperm ke medium kultur. Persentase eksplan yang mengalami *browning* dihitung saat adanya perubahan warna pada permukaan eksplan dari

putih menjadi kecoklatan lebih dari 50%. Menurut Hutami (2008), pencoklatan atau *browning* merupakan kondisi yang sering terjadi pada eksplan kultur *in vitro* yang dapat menghambat pertumbuhan dan kematian jaringan.

Hasil sidik ragam pada persentase *browning* dengan taraf kesalahan 5% (Tabel 2 dan Lampiran 7b) menunjukkan bahwa terdapat beda nyata antar perlakuan. Hal ini menunjukkan sterilisasi eksplan embrio dan endosperm kepel dengan berbagai konsentrasi NaOCl memberikan pengaruh nyata terhadap persentase eksplan *browning* pada hari ke-60 setelah tanam.

Berdasarkan hasil pengamatan (Tabel 2), perlakuan eksplan endosperm yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 10 menit dan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 10 menit memberikan hasil persentase *browning* terendah (0%). Hal ini diduga NaOCl konsentrasi tinggi mampu menghambat proses oksidasi senyawa *fenol*, sehingga eksplan tidak mengalami *browning*. Perolehan persentase eksplan *browning* tertinggi pada perlakuan endosperm yang disterilisasi menggunakan NaOCl konsentrasi 5% selama 5 menit (88,89%). Hal ini diduga NaOCl dengan konsentrasi 5% belum mampu menahan senyawa *fenol* yang keluar dari eksplan, sehingga teroksidasi dan menyebabkan *browning*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi NaOCl, maka tingkat persentase *browning* semakin tinggi. Hasil penelitian Setiani, dkk., (2018), bahwa sterilisasi eksplan daun sukun (*Artocarpus altilis*) menggunakan NaOCl 5,25% selama 5 menit dan NaOCl 5,25% selama 10 menit persentase *browning* tinggi (90%).

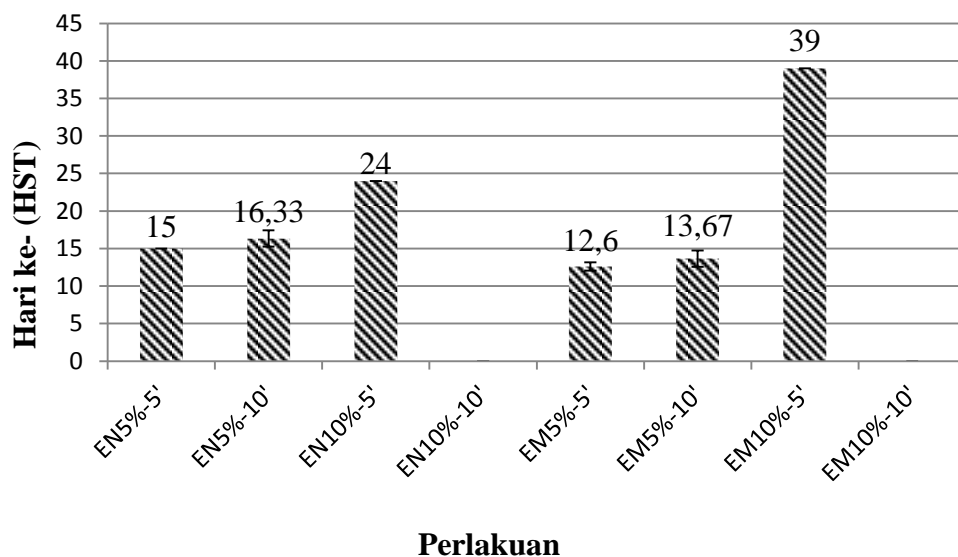
Hal tersebut tidak sesuai dengan pernyataan Rismayani dan Hamzah (2010), yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi NaOCl yang berkontak dengan eksplan, maka semakin luas permukaan eksplan yang mengalami *browning*.

Browning terjadi pada eksplan embrio dan endosperm disebabkan adanya pelukaan pada eksplan. Pelukaan yang dilakukan pada eksplan yaitu pada saat pemotongan eksplan dan penyayatan permukaan eksplan. Menurut Hatmi dkk (2014), biji kepel mengandung senyawa *saponin, flavoid, polifenol dan alkaloid*. Senyawa *Polifenol* tersebut yang menyebabkan *browning*. Selain itu embrio dan endosperm yang digunakan berasal dari biji buah yang telah masak dan tua, sehingga embrio dan endosperm berumur tua. Semakin tua umur eksplan maka kandungan *polifenol* semakin tinggi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Preece and Compton (1991) bahwa eksplan yang telah tua akan mengeluarkan hasil oksidasi yang lebih banyak dibandingkan dengan eksplan muda.

Menurut Lerch (1981), *browning* pada jaringan terjadi karena senyawa yang mengandung tembaga seperti *polifenol* yang teroksidasi oleh oksigen sehingga membentuk quinon dan mengaktifkan enzim oksidase seperti *polifenol oksidase* dan *tirosinase*. Enzim ini akan disintesis pada kondisi oksidatif pada saat jaringan dilukai. Jaringan yang dilukai akan berubah warna menjadi kecoklatan atau kehitaman yang dapat menyebabkan eksplan gagal tumbuh. Kecepatan eksplan mengalami *browning* dapat dilihat melalui waktu eksplan mengalami *browning* setelah penanaman.

4. Saat Eksplan *Browning*

Saat eksplan *browning* merupakan indikator untuk mengetahui kecepatan *browning* pada eksplan sejak awal penanaman hingga eksplan *browning*. Saat eksplan *browning* diamati setiap 3 hari sekali. Hal tersebut ditentukan dengan menghitung dari hari pertama (awal penanaman) hingga muncul *browning* lebih dari 50% pada permukaan eksplan. Selanjutnya, eksplan yang telah *browning* akan dihitung di akhir pengamatan untuk mengetahui persentase *browning*. Hasil pengamatan saat eksplan *browning* disajikan pada Gambar 4.



Gambar 2. Pengaruh NaOCl terhadap waktu eksplan embrio dan endosperm *browning*.

Keterangan :

- EN 5%-5' = Endosperm → NaOCl 5% selama 5 menit
- EN 5%-10' = Endosperm → NaOCl 5% selama 10 menit
- EN 10%-5' = Endosperm → NaOCl 10% selama 5 menit
- EN 10%-10' = Endosperm → NaOCl 10% selama 10 menit
- EM 5%-5' = Embrio → NaOCl 5% selama 5 menit
- EM 5%-10' = Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit
- EM 10%-5' = Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit
- EM 10%-10' = Embrio → NaOCl 10% selama 10 menit

HST = Hari Setelah Tanam.

Berdasarkan histogram (Gambar 4), perlakuan eksplan endosperm yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 10 menit dan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 10 menit tidak mengalami *browning*, sehingga tidak terdapat waktu muncul *browning* pada eksplan. Perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 5 menit eksplan waktu *browning* paling lama pada hari ke-39 HST. Hal ini menunjukkan bahwa NaOCl dengan konsentrasi 10% dapat menghambat proses *browning* pada eksplan. Waktu *browning* tercepat pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 5% selama 5 menit pada hari ke 12,6 HST. Konsentrasi NaOCl 5% belum dapat menghambat proses *browning*. Hal ini diduga pada konsentrasi tersebut hanya mampu menghilangkan senyawa *fenol* yang keluar di permukaan eksplan melalui pembilasan.

Menurut Hamzah (2012) pembilasan dapat membantu mengeluarkan senyawa *fenol* yang ada pada eksplan. Pembilasan yang dilakukan pada proses sterilisasi menggunakan NaOCl akan mengurangi jumlah senyawa *fenol* yang masih berada di dalam eksplan, sehingga waktu untuk terjadinya *browning* lebih lama.

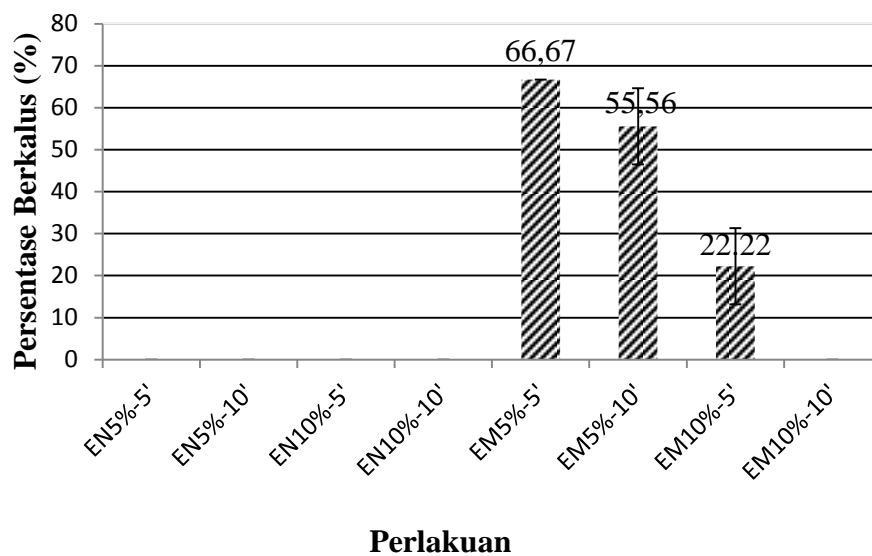
B. Pertumbuhan Kalus Pada Eksplan

Pertumbuhan eksplan dalam kultur *in vitro* merupakan respon eksplan terhadap medium yang digunakan. Eksplan dikategorikan mengalami pertumbuhan apabila eksplan berkembang membentuk kalus atau tunas. Parameter

yang digunakan pada pertumbuhan eksplan yaitu persentase eksplan berkalus, saat muncul kalus, diameter kalus, warna kalus dan tekstur kalus.

1. Persentase Eksplan Berkalus

Persentase eksplan berkalus merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui respon pertumbuhan eksplan pada suatu media. Respon tersebut menunjukkan bahwa eksplan masih hidup dan mengalami pertumbuhan. Hasil rerata persentase eksplan berkalus disajikan pada gambar 5.



Gambar 3. Pengaruh NaOCl terhadap persentase eksplan berkalus.

Keterangan : EN 5%-5' = Endosperm → NaOCl 5% selama 5 menit
 EN 5%-10' = Endosperm → NaOCl 5% selama 10 menit
 EN 10%-5' = Endosperm → NaOCl 10% selama 5 menit
 EN 10%-10' = Endosperm → NaOCl 10% selama 10 menit
 EM 5%-5' = Embrio → NaOCl 5% selama 5 menit
 EM 5%-10' = Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit
 EM 10%-5' = Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit
 EM 10%-10' = Embrio → NaOCl 10% selama 10 menit

Berdasarkan histogram (Gambar 5), Perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 5% selama 5 menit memperoleh persentase eksplan berkalus paling tinggi (66,67%), sedangkan persentase eksplan berkalus terendah (22,22%) pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 5 menit. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan embrio lebih tahan terhadap pemaparan bahan kimia dibanding dengan endosperm pada tahap sterilisasi. Konsentrasi NaOCl 10% diduga bersifat racun pada eksplan, sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan. Eksplan embrio memiliki respon pertumbuhan kalus tinggi dibanding dengan endosperm. Hal ini karena embrio merupakan organ yang tersusun atas sel yang meristematik, sehingga lebih aktif dalam pembelahan sel.

Eksplan endosperm tidak mengalami pertumbuhan kalus diduga karena endosperm yang digunakan telah masak dan berumur tua, sehingga jaringan dalam endosperm tidak aktif membelah. Suryowinoto (1996) menjelaskan bahwa endosperm yang masih muda baik digunakan sebagai eksplan dalam kultur *in vitro*, karena jaringan fisiologis masih hidup. Selain itu, pertumbuhan kalus pada eksplan endosperm optimal diinkubasi tanpa cahaya atau gelap. Eksplan berkalus menandakan bahwa eksplan dapat menyerap nutrisi dari medium. Penggunaan medium *Murashige and Skoog* (MS) yang ditambah zat pengatur tumbuh (ZPT) 2,4-D 2 ppm/l dan BAP 0,5 ppm/l dapat mempengaruhi pertumbuhan kalus pada eksplan.

Menurut Marlina (2004) medium *Murashige and Skoog* (MS) merupakan medium yang umum digunakan dalam kultur *in vitro*. Hal ini

karena medium MS mengandung unsur hara makro esensial, mikro dan vitamin yang dibutuhkan untuk pertumbuhan eksplan. Medium MS ditambah zat pengatur tumbuh (ZPT) untuk mempercepat pertumbuhan eksplan. Rahmawati, dkk., (2009) menjelaskan bahwa ZPT merupakan senyawa organik bukan hara dalam jumlah sedikit (hormon) yang dapat mendukung, menghambat dan mengubah proses fisiologis tumbuhan. Penambahan ZPT bertujuan untuk mengontrol organogenesis dan morfogenesis dalam pembentukan kalus, tunas dan akar yang lebih cepat.

Jenis ZPT yang ditambahkan dalam medium yaitu auksin jenis 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) sebanyak 2 ppm/liter dan sitokinin jenis 6-Benzylamino purine (BAP) sebanyak 0,5 ppm/liter. Hasil penelitian Mahadi, dkk., (2016) bahwa penambahan ZPT 2,4-D 2 ppm/l dan BAP 0,5 ppm/l untuk induksi kalus biji jeruk kasturi (*Citrus microcarpa*) menghasilkan pertumbuhan kalus 100%. Menurut Andaryani (2010) hormon auksin berperan untuk merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan, sedangkan hormon sitokinin berperan untuk meningkatkan pembelahan sel pada jaringan, serta mengatur perkembangan dan pertumbuhan eksplan menjadi tunas.

Eksplan embrio digunakan untuk membentuk embrio somatik karena bersifat meristematik. Menurut Purnamaningsih (2002), embrio somatik merupakan suatu proses perkembangan sel somatik membentuk tumbuhan baru tanpa melalui fusi gamet. Embrio somatik dicirikan dengan struktur yang bipolar yang mempunyai dua calon meristem akar dan tunas. Hal tersebut ditambahkan Sukamto (2010) bahwa penggunaan eksplan embrio dapat

mempercepat pertumbuhan kalus dan tunas pada eksplan. Menurut Rineksane *et al.*, (2013), eksplan terbentuk kalus melalui sisi eksplan yang terluka. Namun, pembentukan kalus dapat terhambat akibat *browning* pada eksplan yang disebabkan oleh oksidasi senyawa *fenolik* yang dilepaskan oleh sel-sel yang terluka.

Pada penelitian ini, terdapat eksplan *browning*, tetapi eksplan tersebut tetap mengalami pertumbuhan kalus, sehingga jaringan pada embrio masih berfungsi (Gambar 6). Hal ini sesuai dengan pernyataan Sukamto (2010) bahwa terjadinya *browning* tidak selalu menandakan eksplan mati, tetapi eksplan masih dapat tumbuh walaupun mengalami *browning* berat.



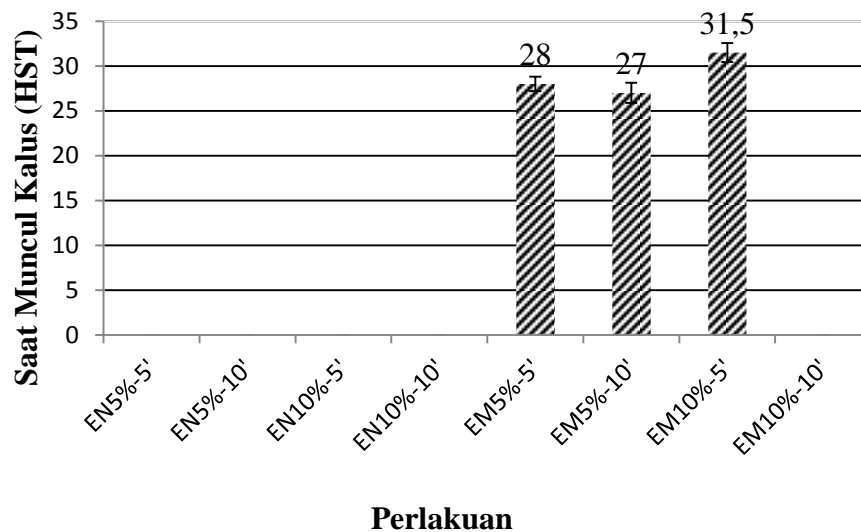
Gambar 4. Kalus pada eksplan embrio mengalami *browning* (Dokumentasi pribadi, 2018).

Widyastuti (1999) menjelaskan bahwa kalus terbentuk diawali dengan inisiasi kalus. Inisiasi kalus dimulai dengan pengembangan atau pembekakan sel eksplan. Jaringan parenkim yang menyusun embrio pada tempat tertentu melakukan pembelahan sehingga menambah jumlah sel. Sel-sel tersebut akan mendesak sel-sel yang sudah ada, sehingga terbentuk pembengkakan di bawah epidermis. Sel-sel mesofil mengalami dediferensiasi sehingga

membelah membentuk kelompokan sel yang lebih besar dan menonjol pada permukaan epidermis. Kelompok sel terus mengembang menjadi tonjolan yang lebih besar sehingga merusak susunan sel-sel epidermis dan massa kalus mulai keluar dari bagian bawah epidermis. Selanjutnya Marlin dkk., (2012) dan Ariani dkk., (2016) menambahkan bahwa kalus terbentuk disebabkan adanya rangsang luka. Luka pada eksplan menyebabkan ZPT yang diberikan lebih mudah terdifusi ke dalam jaringan untuk membentuk kalus dengan menstimulasi pembelahan sel terutama pada area luka. Hal tersebut menyebabkan kesetimbangan pada dinding sel berubah arah, sebagian protoplas mengalir ke luar sehingga mulai terbentuk kalus.

2. Saat Muncul Kalus

Saat muncul kalus merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan eksplan dalam pembentukan kalus. Kecepatan muncul kalus dipengaruhi oleh jenis eksplan dan medium yang digunakan dalam kultur *in vitro*. Kecepatan muncul kalus diamati untuk mengetahui lama eksplan tumbuh kalus dari awal inokulasi. Rerata eksplan saat muncul kalus disajikan pada gambar 7.



Perlakuan

Gambar 5. Pengaruh NaOCl terhadap waktu eksplan saat muncul kalus.

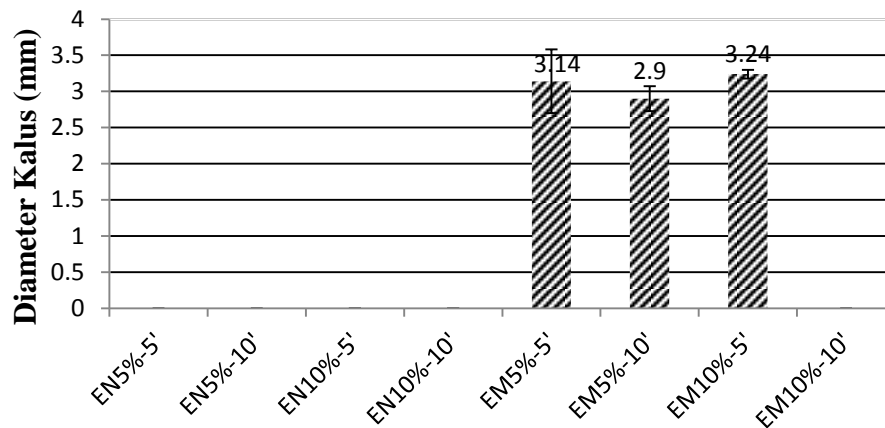
Keterangan : EN 5%-5' = Endosperm → NaOCl 5% selama 5 menit
 EN 5%-10' = Endosperm → NaOCl 5% selama 10 menit
 EN 10%-5' = Endosperm → NaOCl 10% selama 5 menit
 EN 10%-10' = Endosperm → NaOCl 10% selama 10 menit
 EM 5%-5' = Embrio → NaOCl 5% selama 5 menit
 EM 5%-10' = Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit
 EM 10%-5' = Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit
 EM 10%-10' = Embrio → NaOCl 10% selama 10 menit
 HST = Hari Setelah Tanam

Berdasarkan histogram (Gambar 7), pada perlakuan eksplan embrio disterilisasi NaOCl 5% selama 10 menit waktu muncul kalus cenderung lebih cepat pada hari ke-27 HST, eksplan embrio disterilisasi NaOCl 5% selama 5 menit pada hari ke-28 HST. Waktu muncul kalus cenderung lebih lama pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 10% selama 5 menit pada hari ke-31,5 HST. Hal ini menunjukkan bahwa sterilisasi menggunakan NaOCl 10% menyebabkan jaringan rusak, sehingga dapat menghambat pembelahan sel. Kecepatan muncul kalus yang tidak jauh berbeda dikarenakan penambahan ZPT pada medium dalam jumlah yang sama. ZPT yang ditambahkan pada medium MS yaitu 2,4-D 2 ppm/l dan BAP 0,5 ppm/l.

Menurut Ariani dkk., (2016), waktu terbentuknya kalus cenderung lebih cepat ketika konsentrasi 2,4-D lebih tinggi dibanding BAP. Ketika konsentrasi auksin eksogen tinggi, protein *Aux/IAA* pada eksplan menjadi tidak stabil akibat degradasi dengan cepat dan tidak terjadi proses akumulasi. Hal tersebut mengakibatkan *Aux/IAA* berhenti melakukan penekanan gen dan auksin berekspresi. Marlin (2007) menambahkan bahwa kecepatan pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh sukrosa dalam media tanam. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Argaloka (2013) bahwa waktu muncul kalus pada eksplan kotiledon biji *Acacia mangium* yang diinokulasi pada medium MS + 2,4-D 2 ppm/l dan BAP 1 ppm/l tercepat pada hari ke-29 setelah tanam.

3. Diameter Kalus

Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dapat dilihat pada diameter kalus. Diameter kalus merupakan indikator untuk mengetahui perkembangan kalus pada eksplan yang menggambarkan penampilan visual kalus. Selain itu, parameter tersebut digunakan untuk mengetahui sel yang masih aktif membelah atau telah mati. Rerata diameter kalus disajikan pada gambar 8.



Perlakuan

Gambar 6. Pengaruh NaOCl terhadap diameter kalus embrio umur 60 HST.

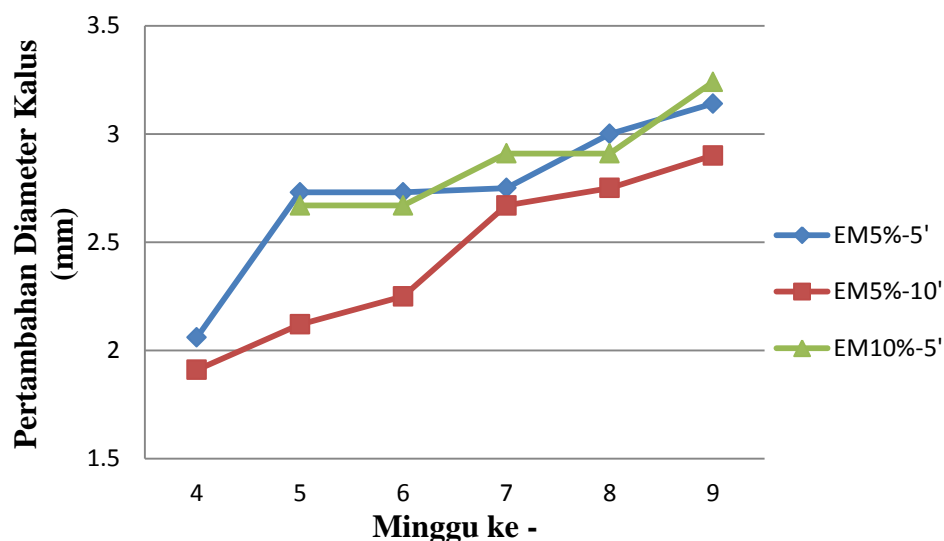
Keterangan :

EN 5%-5'	= Endosperm → NaOCl 5% selama 5 menit
EN 5%-10'	= Endosperm → NaOCl 5% selama 10 menit
EN 10%-5'	= Endosperm → NaOCl 10% selama 5 menit
EN 10%-10'	= Endosperm → NaOCl 10% selama 10 menit
EM 5%-5'	= Embrio → NaOCl 5% selama 5 menit
EM 5%-10'	= Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit
EM 10%-5'	= Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit
EM 10%-10'	= Embrio → NaOCl 10% selama 10 menit

Berdasarkan histogram (Gambar 8), rerata diameter kalus pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 10% selama 5 menit cenderung paling besar (3,24 mm) dibanding dengan perlakuan eksplan embrio disterilisasi NaOCl 5% selama 5 menit (3,14 mm), sementara perlakuan embrio disterilisasi NaOCl 5% selama 10 menit memperoleh diameter kalus paling kecil (2,97 mm). Hal ini menandakan bahwa terilisasi embrio pada konsentrasi NaOCl 5% selama 5 menit tidak mengakibatkan jaringan mati, sehingga masih aktif membelah yang didukung pada persentase eksplan berkalus paling tinggi. Ukuran diameter kalus dapat dipengaruhi oleh penggunaan 2,4-D dan BAP.

Menurut Syahid dkk., (2010) bahwa aplikasi kombinasi auksin dan sitokinin pada konsentrasi tepat mampu menghasilkan kalus. Penambahan sitokinin ke dalam media yang sudah mengandung auksin dapat merangsang pertumbuhan kalus karena kedua zat pengatur tumbuh tersebut bekerja secara sinergis. Adanya sitokinin yang dapat meningkatkan pembelahan sel dalam proses sitokinesis terutama pada saat sintesis RNA dan protein akan memacu aktivitas auksin dalam pembelahan sel membentuk kalus.

Pertumbuhan kalus dapat dilihat pada pertambahan diameter kalus setiap minggu dari awal muncul kalus hingga akhir pengamatan. Pertambahan diameter kalus dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 7. Rerata pertambahan diameter kalus embrio setiap minggu

Keterangan : EM 5%-5' = Embrio → NaOCl 5% selama 5 menit
 EM 5%-10' = Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit
 EM 10%-5' = Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit

Pada Gambar 9, dapat dilihat bahwa pertambahan diameter kalus dimulai pada minggu keempat hingga minggu kedelapan. Perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 5% selama 5 menit pada

minggu ke-4 sampai ke-5 mengalami peningkatan diameter kalus lebih tinggi dibanding dengan minggu lainnya yang cenderung stabil. Pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 5% selama 10 menit mengalami peningkatan pertambahan diameter kalus cenderung stabil dibanding dengan perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 5 menit pertambahan diameter kalus cenderung lebih lambat. Pertumbuhan kalus tersebut menunjukkan eksplan menyerap nutrisi dan air pada media. Menurut Litz dkk. (1995), penggunaan kombinasi antara auksin dengan sitokinin akan meningkatkan proses induksi kalus. Yusnita (2004) menambahkan bahwa penggunaan auksin dan sitokinin yang seimbang akan memacu pembentukan kalus, sehingga membuat pertambahan ukuran pada diameter kalus.

4. Warna Kalus

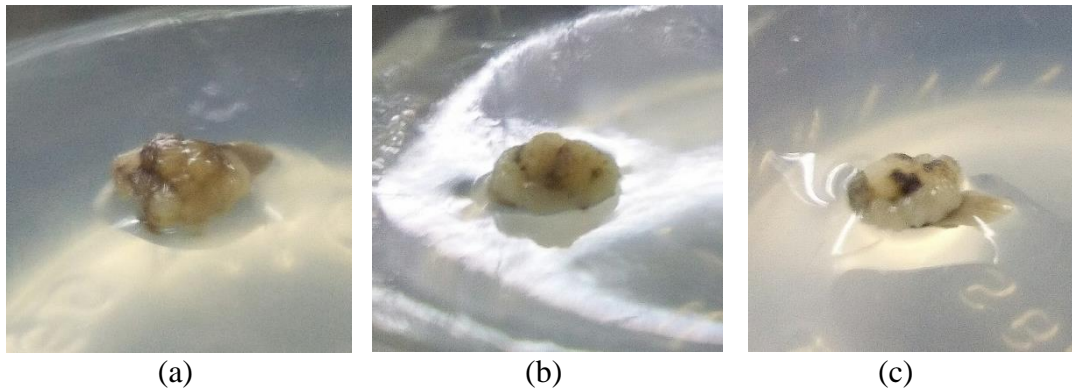
Warna kalus merupakan salah satu indikator untuk mengetahui perkembangan kalus melalui kenampakan visul serta menjadi indikator bahwa jaringan pada eksplan masih aktif untuk membelah atau telah mati. Pengamatan warna kalus dilakukan pada eksplan umur 60 hari setelah tanam. Hasil pengamatan disajikan pada Tabel 3.

Tabel 2. Pengaruh sterilisasi NaOCl terhadap warna dan terktur kalus

Perlakuan	Warna Kalus	Tekstur Kalus
EN5%-5' = Endosperm → NaOCl 5% selama 5 menit	-	-
EN5%-10' = Endosperm → NaOCl 5% selama 10 menit	-	-
EN10%-5' = Endosperm → NaOCl 10% selama 5 menit	-	-
EN10%-10' = Endosperm → NaOCl 10% selama 10 menit	-	-
EM5%-5' = Embrio → NaOCl 5% selama 5 menit	Kekuningan	Kompak
EM5%-10' = Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit	Kekuningan	Remah
EM10%-5' = Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit	Putih	Kompak
EM10%-10' = Embrio → NaOCl 10% selama 10 menit	-	-

Keterangan : (-) = Tidak tumbuh kalus.

Hasil pengamatan (Tabel 3), kalus pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 5% selama 5 menit dan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 5% selama 10 menit rerata warna kalus kekuningan, sedangkan kalus pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 10% selama 5 menit kalus berwarna putih (Gambar 10). Mahadi, dkk., (2016) menjelaskan bahwa pertumbuhan sel pada kalus yang berwarna kekuningan memiliki aktifitas pembelahan yang rendah. Yusnita (2003) menambahkan bahwa kalus yang berwarna kecoklatan diakibatkan adanya metabolisme senyawa *fenol* yang bersifat toksik dan dapat mengakibatkan kalus *browning*, sehingga dapat menghambat pertumbuhan eksplan. Gambar kalus disajikan pada gambar 10.



Gambar 8. Kalus yang tumbuh pada embrio kepel umur 60 HST (a) EM5%-5', (b) EM5%-10', (c) EM10%-5'.

Mahadi dkk., (2014) menjelaskan bahwa kalus yang berwarna putih merupakan jaringan embrionik yang belum mengandung kloroplas, akan tetapi memiliki kandungan butir pati yang tinggi. Selain itu, kalus yang berwarna putih mengindikasikan bahwa pertumbuhan kalus dalam keadaan cukup baik. Sedangkan Hendaryono dan Wijayani (1994) melaporkan bahwa perbedaan warna kalus dihasilkan karena perbedaan perkembangan pada setiap kalus yang memunculkan warna yang berbeda-beda. Perbedaan tersebut dapat dipengaruhi oleh pigmenitas, intensitas cahaya dan sumber eksplan yang digunakan.

5. Tekstur Kalus

Tekstur kalus merupakan indikator yang digunakan untuk mengetahui kualitas kalus. Tekstur kalus dibedakan menjadi 3 macam yaitu : kompak (*non friable*), kosong dan remah (*friable*). Kalus yang baik diasumsikan memiliki tekstur remah (*friable*). Tekstur yang remah dianggap baik karena selnya mudah dipisahkan untuk menjadi sel tunggal.

Hasil pengamatan visual (Tabel 3), menunjukkan bahwa terdapat perbedaan tekstur kalus antar perlakuan. Perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 5% selama 10 menit kalus bertekstur remah (*friable*). Kalus bertekstur remah menandakan bahwa pembelahan sel pada eksplan lebih cepat dibanding yang bertekstur kompak. Hal tersebut dapat dilihat pada waktu saat muncul kalus dan pertumbuhan diameter kalus yang terjadi pada sekitar hari ke-27 HST. Eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 5% selama 5 menit dan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 10 selama 5 menit kalus bertekstur kompak (*non friable*) (Gambar 10). Apriyastuti (2014) melaporkan bahwa kalus bertekstur kompak diduga akibat perbedaan kemampuan jaringan tanaman yang menyerap unsur hara dan ZPT dalam media.

Menurut Mahadi dkk., (2016), terbentuknya tekstur kalus kompak disebabkan kalus mengalami pembentukan lignifikasi, sehingga kalus memiliki tekstur yang keras. Hal ini dampak dari sitokinin yang berperan dalam transport zat hara. Warna kalus kekuningan dengan tekstur remah pada eksplan embrio bersifat embriogenik. Mahadi (2012) menjelaskan bahwa kalus embriogenik memiliki ciri-ciri kalus bertekstur remah dan mudah terurai, berwarna putih kekuningan, tidak mudah *browning* dan sel-selnya mudah berkembang biak. Rineksane *et al.*, (2011) menambahkan bahwa kalus yang bertekstur remah dengan warna kekuningan merupakan kalus embriogenik.