

#### IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi adalah teknik membersihkan, membebaskan suatu benda dan menjaga kondisi ruang dari segala kehidupan mikroorganisme (protozoa, fungi, bakteri dan virus). Sterilisasi menentukan keberhasilan teknik kultur *in vitro*, oleh karena itu metode sterilisasi yang tepat sangat diperlukan untuk keberhasilan eksplan endosperm kepel dalam kultur *in vitro*.

Perbanyakan tanaman dengan teknik kultur *in vitro* tidak terlepas dari kegagalan yang dapat diakibatkan oleh kontaminasi. Sumber kontaminasi dapat berasal dari tanaman baik internal maupun eksternal, media kultur yang tidak disterilkan dengan baik, kondisi lingkungan dan cara kerja sterilisasi yang salah (Onwubiko *et al.*, 2003). Kontaminasi pada kultur *in vitro* biasanya terjadi pada saat awal penanaman eksplan ke dalam media tanam. Pada tahapan ini eksplan yang berasal dari lingkungan yang tidak steril dibawa ke dalam lingkungan steril (labolatorium) sehingga kemungkinan eksplan terkontaminasi besar. Kontaminasi yang diakibatkan oleh fungi dan bakteri dapat mengurangi produktivitas keberhasilan kultur (Colgecan *et al.*, 2011).

Kondisi ruang kerja aseptis dan optimasi sterilisasi eksplan merupakan syarat untuk dapat meningkatkan keberhasilan eksplan tumbuh. Eksplan yang akan ditumbuhkan pada medium kultur harus dalam keadaan steril. 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 yang

digunakan. Pengujian bahan sterilan pada penelitian ini dilakukan sebanyak 2 kali dimana pada setiap pengujian menggunakan konsentrasi yang berbeda beda.

## A. Sterilisasi Tahap 1

### 1. Persentase Kontaminasi

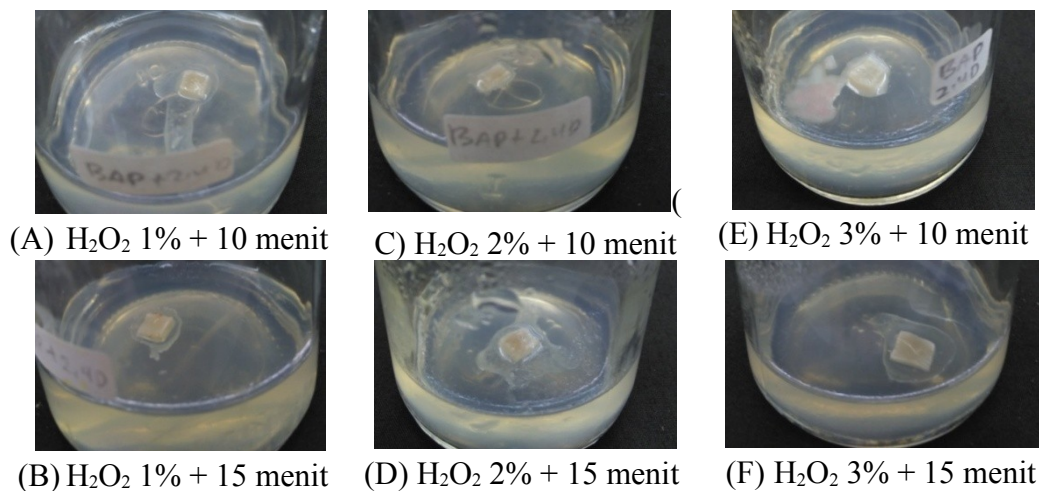
Pengujian hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) terhadap tingkat kontaminasi eksplan endosperm kepel dengan berbagai konsentrasi dilakukan untuk mendapatkan perlakuan sterilisasi yang optimal. Hasil pengamatan percobaan pertama berupa tingkat kontaminasi eksplan oleh bakteri dan cendawan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Sterilisasi terhadap Persentase Kontaminasi, Browning dan Hidup Eksplan Endosperm Kepel pada 5 Minggu Setelah Tanam.

Perlakuan	Persentase (%)			Jenis Kontaminasi	Saat Kontaminasi (HST)
	Hidup	Kontaminasi	Browning		
A = $H_2O_2$ 1% + 10 menit	0%	100%	0%	Bakteri	4,7
B = $H_2O_2$ 1% + 15 menit	0%	89%	0%	Bakteri	4,5
C = $H_2O_2$ 2% + 10 menit	0%	100%	0%	Bakteri	3,7
D = $H_2O_2$ 2% + 15 menit	0%	89%	11%	Bakteri	4,5
E = $H_2O_2$ 3% + 10 menit	0%	100%	11%	Bakteri	11,0
F = $H_2O_2$ 3% + 15 menit	0%	89%	11%	Bakteri	8,6

Hasil pengamatan sterilisasi tahap 1 terhadap pengujian tingkat kontaminasi eksplan endosperm kepel dengan perendaman bahan sterilan  $H_2O_2$  menunjukkan bahwa pada perlakuan  $H_2O_2$  1% selama 10 menit, 2% selama 10 menit dan 3% selama 10 menit mengalami kontaminasi sebesar 100%. Sementara pada perlakuan  $H_2O_2$  1% selama 15 menit, 2% selama 15 menit dan 3% selama 15 menit eksplan endosperm kepel mengalami kontaminasi sebesar 89% (tabel 1). Persentase kontaminasi yang tinggi pada sterilisasi tahap 1 menunjukkan bahwa penggunaan bahan sterilan  $H_2O_2$  pada konsentrasi rendah tidak dapat menghilangkan keberadaan agen kontaminasi yang terdapat pada permukaan

eksplan endosperm kepel sehingga sumber kontaminasi mampu bertahan hidup pada eksplan. Menurut Martiansyah dkk., (2013) konsentrasi  $H_2O_2$  yang digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan biasanya berkisar 3-20% namun tergantung pada jenis eksplan yang digunakan.



Gambar 1. Eksplan endosperm kepel mengalami kontaminasi oleh bakteri pada 5 minggu setelah tanam.

Kontaminasi yang terjadi pada eksplan endosperm kepel diduga disebabkan oleh beberapa faktor antara lain konsentrasi bahan sterilan yang digunakan dan lama perendaman bahan sterilan yang masih kurang serta sumber eksplan yang terinfeksi oleh mikroba. Perendaman eksplan endosperm menggunakan  $H_2O_2$  selama 10 menit dan 15 menit belum mampu mencegah terjadinya kontaminasi oleh bakteri, hal ini disebabkan kemampuan bakteri yang telah terlebih dahulu menginfeksi ataupun kemampuan bakteri dalam menetralkan senyawa antimikroba. Menurut Nasution (2013) bakteri memiliki kemampuan menetralkan senyawa antimikroba karena adanya *glycocalyx* yang melindungi diri dari senyawa beracun.

Eksplan yang digunakan berupa endosperm kepel yang diduga eksplan sudah terdapat bakteri endofit yang hidup di dalam eksplan. Eksplan yang mengandung bakteri dapat menyebabkan kontaminasi pada saat diinkubasikan walaupun pada saat inokulasi tidak menunjukkan gejala. Menurut Oduyayo *et al.*, (2007) dalam Nasution (2013) mikroorganisme penyebab kontaminasi banyak terdapat pada sumber eksplan, ruang inokulasi, alat sterilisasi dan tangan manusia yang mengandung 34%-46% sumber kontaminasi.

## **2. Jenis dan Saat Kontaminasi**

Pengamatan jenis dan saat kontaminasi dilakukan untuk mengetahui penyebab kontaminasi yang terjadi pada eksplan endosperm kepel dan waktu terjadinya kontaminasi. Kontaminasi eksplan endosperm kepel pada semua perlakuan disebabkan oleh bakteri dan mengalami waktu terjadinya kontaminasi berbeda beda pada setiap perlakuan.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dan hasil pengamatan pada tabel 1 menunjukkan bahwa perlakuan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang digunakan hanya mampu menekan kontaminasi yang disebabkan oleh jamur namun tidak dengan kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri. Gejala yang ditimbulkan dari adanya kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri dicirikan dengan munculnya lendir berwarna putih keruh di permukaan media, selanjutnya bakteri akan tumbuh berkembang di sekeliling eksplan dan menutupi seluruh permukaan eksplan sehingga menyebabkan eksplan mati.

Eksplan endosperm kepel mengalami kontaminasi tercepat pada hari ke-3,7 setelah tanam sebesar 100% yang terjadi pada perlakuan (B) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% selama

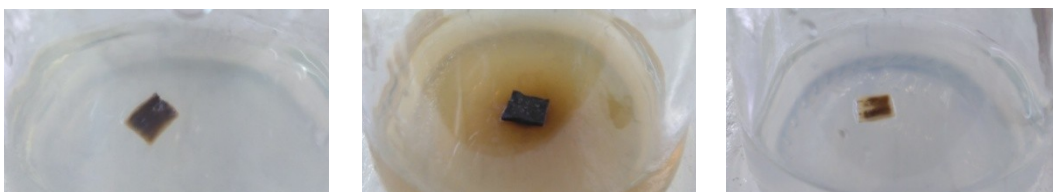
10 menit. Menurut Akin-Idowu., (2009) kontaminasi pada kultur *in vitro* terjadi pada awal inisiasi eksplan. Kontaminasi dapat tumbuh cepat atau lambat berkaitan dengan dormansi. Menurut Rappe dan Giovannoni (2003) dalam Putri dkk., (2017) kontaminasi pada kultur *in vitro* dapat berkembang cepat secara kompetitif pada lingkungan kultur yang mempunyai ketersediaan nutrisi tinggi dan akan berkembang lambat menggunakan strategi anabiosis (pengurangan metabolisme sel pada waktu tertentu saat keadaan lingkungan tidak menguntungkan).

Besarnya konsentrasi dan lama waktu perendaman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juga berpengaruh terhadap kecepatan eksplan mengalami kontaminasi. Hal ini dikarenakan bahan sterilan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serta waktu perendaman 10 menit dan 15 menit yang dilakukan kurang kuat, sehingga eksplan mengalami kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri pada permukaan eksplan. Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri pada permukaan eksplan dalam jangka waktu yang relatif cepat eksudat akan menyebar ke seluruh bagian eksplan dan menyebabkan eksplan mengalami kematian. Hal ini sesuai dengan pernyataan Yoga (2016) bahwa sumber kontaminasi yang berada pada bagian permukaan memiliki respon kontaminasi yang sangat cepat, dalam waktu 2 x 24 jam sudah bisa nampak. Pada kultur *in vitro* kontaminasi mikroba terutama bakteri menjadi permasalahan utama (Marino *et al.*, 2009). Menurut Gunawan (1988) dalam Hardiyadi (2014) untuk mencegah kontaminasi pada bahan tanam yang sudah mengandung kontaminan internal harus diberi perlakuan fungisida sistemik.

### 3. Persentase *Browning*

Pencoklatan (*browning*) atau hitam (*blackening*) pada eksplan setelah inokulasi dapat menghambat pertumbuhan dan menyebabkan kematian pada jaringan eksplan. Pencoklatan sangat umum terjadi pada tanaman berkayu terutama bila eksplan diambil dari pohon dewasa. Penghambatan pertumbuhan pada eksplan biasanya sangat kuat pada beberapa spesies yang mengandung senyawa tanin atau hidroksil fenol dengan konsentrasi tinggi.

Pada percobaan penelitian tahap 1 yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pada perlakuan  $H_2O_2$  1% selama 10 menit, 2% selama 10 menit dan 3% selama 10 menit tidak berpengaruh terhadap persentase tingkat *browning* pada eksplan endosperm kepel. Sementara pada perlakuan  $H_2O_2$  1% selama 15 menit, 2% selama 15 menit dan 3% selama 15 menit menunjukkan bahwa eksplan endosperm kepel mengalami *browning* sebesar 11%. Penyebab utama rendahnya persentase *browning* dikarenakan eksplan endosperm kepel mengalami kontaminasi sehingga menyebabkan kematian pada awal pengamatan (tabel 1).



D =  $H_2O_2$  1% + 15 menit    E =  $H_2O_2$  2% + 15 menit    F =  $H_2O_2$  3% + 15 menit

Gambar 2. Eksplan endosperm mengalami *browning* pada 5 MST

Eksplan endosperm kepel mengalami *browning* juga disebabkan terjadi pelukaan sebelum dilakukan inokulasi sehingga mengeluarkan senyawa fenol dan menyebabkan jaringan yang diisolasi menjadi coklat dan gagal tumbuh. Pelukaan pada eksplan dapat memacu stres dan menyebabkan peningkatan aktifitas

fenilalanin amonia liasse yang diikuti oleh produksi fenilporpanoid dan menyebabkan pencoklatan (Sri, 2008). Hal ini sesuai dengan pernyataan Sugiri (2005) dalam Santoso dan Nursandi (2004) eksplan yang mengalami pelukaan maka mengeluarkan fenol yang akan bereaksi dengan enzim fenol oksidase di dalam sitosol sehingga terbentuk quinon yang menyebabkan terjadinya *browning* atau pencoklatan.

#### 4. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup adalah kemampuan eksplan untuk tumbuh dan berkembang dalam suatu media kultur *in vitro*. Persentase eksplan hidup dapat dipengaruhi oleh persentase eksplan terkontaminasi dan persentase eksplan *browning*. Pada penelitian ini yang dimaksud dengan persentase hidup adalah kondisi dimana eksplan masih berwarna putih dan tidak mengalami kontaminasi maupun *browning*. Apabila eksplan maupun media tidak terkontaminasi, eksplan tidak *browning* dan tidak terjadi pertumbuhan kalus hal tersebut masih dikatakan eksplan hidup.

Hasil pengamatan tabel 1 menunjukkan bahwa persentase hidup pada semua perlakuan sebesar 0%, hal ini berarti penggunaan  $H_2O_2$  sebagai bahan sterilan pada konsentrasi rendah tidak berpengaruh terhadap persentase eksplan hidup. Sumber kontaminan diduga sudah terbawa dan tumbuh didalam jaringan eksplan endosperm kepel yang digunakan sebagai eksplan sehingga penggunaan  $H_2O_2$  pada konsentrasi rendah mengalami kegagalan pada persentase eksplan hidup. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rismayani (2010) menyatakan bahwa semakin sedikit konsenstrasi bahan sterilan yang digunakan maka eksplan

semakin rentan terhadap patogen, namun apabila semakin tinggi konsentrasi bahan sterilan maka perkembangan jaringan eksplan menjadi terhambat dan mati.

Kegagalan pada persentase hidup disebabkan tingginya kontaminasi pada awal pengamatan dan *browning* pada eksplan endosperm kepel. Kontaminasi yang terjadi pada eksplan endosperm kepel dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya bahan sterilisasi yang rendah, proses sterilisasi yang kurang sempurna, pekerjaan yang kurang teliti, dan lingkungan kerja atau ruang laboratorium yang banyak mengandung sumber kontaminasi. Menurut Odutayo *et al.*, (2007) dalam Nasution (2013) dari hasil penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa terdapat hubungan antara ruang laboratorium dengan sumber-sumber kontaminan. Mikroorganisme penyebab kontaminasi banyak terdapat pada ruang inokulasi, alat sterilisasi, sumber eksplan dan tangan manusia yang mengandung 34%-46% sumber kontaminasi.

Setelah mengetahui kegagalan dari perlakuan sterilisasi tahap pertama menunjukkan bahwa penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada konsentrasi rendah belum mampu mencegah terjadinya kontaminasi pada permukaan eksplan dan tidak berpengaruh terhadap persentase eksplan hidup, sehingga perlu dilakukan evaluasi pada sterilisasi tahap kedua dengan menggunakan bahan sterilan yang sama dengan menambahkan konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan waktu perendaman eksplan endosperm kepel.

## **B. Sterilisasi Tahap 2**

Pada sterilisasi tahap ke-2 dilakukan perbaikan sterilisasi dari teknik sterilisasi yang sudah dilakukan pada percobaan sebelumnya. Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang digunakan pada percobaan ke-2 yaitu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5%, 10%, dan 15% serta lama



perendaman 10 menit dan 15 menit, hal ini disebabkan penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pada konsentrasi rendah belum mampu menghambat kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri.

Sterilisasi pada tahap ke-2 eksplan endosperm yang sudah direndam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sesuai perlakuan kemudian dibilas sebanyak 3 kali menggunakan aquades steril. Sebelum melakukan inokulasi, eksplan endosperm dicelupkan ke dalam alkohol 96% selama 2-3 detik dan ditiriskan pada tisu steril. Eksplan dapat dikatakan hidup apabila tidak mengalami *browning* dan kontaminasi baik dari bakteri maupun jamur. Hasil pengamatan percobaan ke-2 berupa persentase kontaminasi eksplan oleh bakteri dan cendawan disampaikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh Sterilisasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> terhadap Persentase Kontaminasi, Browning dan Hidup Eksplan Endosperm Kepel pada 9 Minggu Setelah Tanam.

Perlakuan	Persentase (%)			Saat Browning (HST)
	Hidup	Kontaminasi	Browning	
A= H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5% + 10 menit	55,56%	0%	44,44%	5,3
B= H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5% + 15 menit	33,33%	0%	66,67%	3,0
C= H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10% + 10 menit	100,00%	0%	0,00%	0,0
D= H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10% + 15 menit	66,67%	0%	33,33%	27,0
E= H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15% + 10 menit	89,00%	0%	11,11%	21,0
F= H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15% + 15 menit	89,00%	0%	11,11%	21,0

### 1 Persentase Kontaminasi

Pengamatan kontaminasi bertujuan untuk mengetahui banyaknya jumlah eksplan yang mengalami kontaminasi yang dapat disebabkan oleh jamur maupun bakteri. Kontaminasi yang disebabkan oleh bakteri dapat dilihat dengan adanya lendir berwarna putih keruh. Kontaminasi yang disebabkan jamur ditandai dengan adanya miselium berwarna putih tidak berlendir dan semakin lama akan menutupi permukaan medium dan eksplan sehingga menyebabkan kematian. Menurut

Imanudin (2016) pengamatan eksplan yang terkontaminasi bertujuan untuk mengetahui tingkat keberhasilan sterilisasi pada eksplan, alat dan medium yang digunakan.

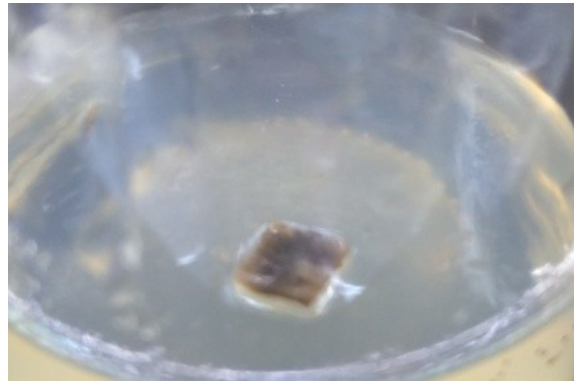
Hasil pengamatan pada tabel 2 menunjukkan bahwa eksplan endosperm kepel pada semua perlakuan tidak mengalami kontaminasi. Diduga penambahan konsentrasi dan lama perendaman  $H_2O_2$  serta perlakuan eksplan endosperm yang dicelupkan kedalam alkohol 96% selama 2-3 detik mampu menekan kontaminasi pada eksplan endosperm kepel. Pada proses kultur *in vitro* jenis dan jumlah bahan sterilan mempengaruhi tingkat kontaminasi, misalnya kultur tanaman pinus di Amerika Utara memerlukan lima jenis bahan sterilan (Traore *et al.*, 2005). Menurut Oyebanji *et al.*, (2009) sterilisasi permukaan eksplan dengan menggabungkan etanol dengan NaOCL atau  $H_2O_2$  terbukti mampu meminimalisir kontaminasi pada beberapa jenis tanaman. Menurut Martiansyah dkk., (2013) pada penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan bahwa sterilisasi dengan menggunakan etanol 70% selama satu menit dan  $H_2O_2$  17,6% selama 20 menit mampu menekan kontaminasi secara signifikan sebesar 21,7% dan persentase eksplan hidup 76,7% pada stek mikro karet, sementara menurut Farooq *et al.*, (2002) penggunaan  $H_2O_2$  12% dan 15 menit waktu perendaman mampu mencegah kontaminasi pada permukaan eksplan biji srikaya sebanyak 50% dan sebagian besar menjadi hitam karena toksisitas. Menurut Nurtjahjaningsih (2009) perendaman benih *Pinus merkusii* dalam larutan  $H_2O_2$  (*hidrogen peroksida*) pada konsentrasi 7% selama 10 menit efektif dalam mengatasi sumber kontaminasi yang terdapat dalam benih.

Hidrogen peroksida dapat menghambat pertumbuhan patogen kontaminan (bakteri dan cendawan) dengan cara menggumpalkan protein atau menghidrolisis sel yang terdapat pada protoplasma. Protein yang telah menggumpal kehilangan fungsinya sehingga menyebabkan bakteri dan mikroba mengalami kematian. Menurut Dita dkk., (2012) cara kerja hidrogen peroksida yaitu dengan memproduksi hidroksil yang bersifat radikal bebas, sehingga dapat menyerang DNA, membran sel dan komponen esensial lainnya pada mikroorganisme. Menurut Srivastava *et al.*, (2010) kelebihan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dibandingkan dengan bahan kimia lainnya yaitu sifatnya yang ramah lingkungan karena mudah terurai menjadi air dan oksigen. Alkohol merupakan salah satu bahan sterilisasi yang efektif dalam meminimalisir terjadinya kontaminasi. Menurut Waluyo (2007) bahwa alkohol merupakan zat yang paling efektif dan dapat diandalkan dalam sterilisasi. Alkohol mendenaturasi protein dengan jalan dehidrasi dan pelarut lemak. Akibatnya membran sel akan rusak dan enzim-enzim akan diinaktifkan oleh alkohol.

## **5. Persentase Eksplan *Browning***

Dalam kultur *in vitro* selain kegagalan yang diakibatkan oleh kontaminasi, persentase *browning* juga dapat terjadi pada eksplan yang umumnya berasal dari tanaman berkayu. Tingginya tingkat *browning* disebabkan karena di dalam eksplan berkayu mempunyai senyawa fenol yang dapat menyebabkan eksplan menjadi *browning* dan akhirnya mati. *Browning* atau pencoklatan merupakan gejala munculnya warna coklat pada eksplan sehingga akan menghambat pertumbuhan eksplan. Menurut Queiroz *et al.*, (2008) dalam Achmad (2014)

menyatakan bahwa terjadinya *browning* disebabkan karena adanya enzim polifenol oksidase yang menyebabkan terjadinya oksidasi senyawa fenol menjadi quinon yang memproduksi pigmen berwarna coklat ketika jaringan terluka.



Gambar 3. *Browning* pada eksplan endosperm

Hasil pengamatan penelitian tahap ke dua menunjukkan bahwa eksplan yang mengalami *browning* tertinggi (66,67%) terjadi pada perlakuan (B) konsentrasi  $H_2O_2$  5% selama 15 menit. Sementara pada perlakuan (C)  $H_2O_2$  10% selama 10 menit eksplan tidak mengalami *browning* (0%). *Browning* pertama kali muncul pada hari ke-3 setelah inokulasi. Penggunaan hidrogen peroksida pada konsentrasi 5% selama 15 menit diduga tidak mampu mencegah senyawa fenol untuk keluar akibat pelukaan sehingga proses oksidasi fenol tidak dapat dihentikan dan menyebabkan fenol teroksidasi sehingga terjadi *browning*.

Tingkat *browning* pada eksplan cukup besar. Hal ini dikarenakan tidak adanya penggunaan perlakuan yang dapat mengurangi terjadinya *browning*. Penggunaan bahan sterilan  $H_2O_2$  dan etanol dengan konsentrasi yang cukup tinggi dapat menyebabkan *browning* dan menurunkan kemampuan regenerasi eksplan endosperm kepel. Farooq *et al.*, (2002) penggunaan  $H_2O_2$  12% dan 15 menit waktu perendaman mampu mencegah kontaminsi pada permukaan eksplan biji srikaya

sebanyak 50% dan sebagian besar menjadi hitam karena toksisitas. Sesuai dengan pernyataan Yang (2009) menyatakan bahwa pemutih dan etanol dengan konsentrasi yang cukup tinggi dapat merusak jaringan eksplan sehingga dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan terjadinya *browning*.

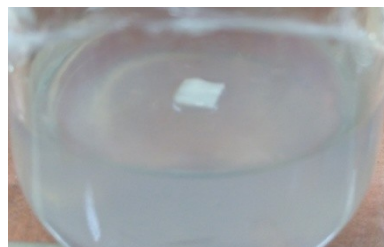
Tingginya persentase *browning* pada eksplan endosperm kepel diduga disebabkan karena konsentrasi bahan sterilan yang cukup tinggi dan proses biologis eksplan yang mengeluarkan senyawa fenol. Menurut Hutapea (1994) dalam Hatmi dkk., (2014) biji buah kepel mengandung senyawa saponin, flavoid, polifenol serta alkaloid. Sementara berdasarkan skrining fitokimia Batubara *et al.*, (2010) menyatakan bahwa sampel biji dan buah kepel yang berasal dari Yogyakarta dan Karanganyar mengandung senyawa flavonoid dan tanin.

Senyawa fenol adalah enzim tirosinase dan polifenol oksidase, dalam kondisi oksidatif akibat pelukaan eksplan, dimana pada saat sel mengalami kerusakan isi dari sitoplasma dan vakuola menjadi tercampur, sehingga senyawa fenol yang teroksidasi akan bersifat racun dan merusak eksplan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Lerch (1981) dalam Sri (2008) pencoklatan jaringan dapat terjadi karena adanya aktivitas enzim oksidase yang mengandung polifenol oksidase dan tirosinase yang dilepaskan atau disintesis dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai, sedangkan menurut George dan Sherrington (1981) *browning* dapat terjadi akibat senyawa fenol yang teroksidasi ketika sel dilukai, sehingga jaringan-jaringan yang diisolasi menjadi coklat atau kehitaman dan menyebabkan kematian atau gagal tumbuh.

Sementara itu persentase *browning* yang tinggi juga dapat disebabkan karena pada saat inokulasi terlalu dekat dengan lampu spiritus yang menyebabkan kerusakan pada jaringan eksplan endosperm. Menurut Murwani (2012) menyatakan bahwa endosperm biji buah sirsak, srikaya dan mulwo terdiri dari selapis yang tersusun rapat seperti epidermis mengelilingi sel-sel parenkim berbentuk isodiametris dan berding tipis yang didalamnya mengandung kelompok-kelompok jaringan.

## 6. Persentase Eksplan Hidup

Persentase eksplan hidup adalah kemampuan eksplan untuk tumbuh dan berkembang dalam suatu media tanam kultur *in vitro*. Pada kultur *in vitro* persentase eksplan hidup dapat dipengaruhi oleh persentase eksplan *browning* dan persentase eksplan kontaminasi. Pada penelitian yang telah dilakukan yang dimaksud dengan persentase hidup adalah kondisi dimana eksplan masih berwarna putih dalam media dan tidak mengalami kontaminasi maupun *browning*. Apabila eksplan maupun media tidak terkontaminasi, tidak *browning* dan tidak terjadi pertumbuhan kalus hal tersebut masih dikatakan hidup.



(A)



(B)

Gambar 4. Eksplan endosperm kepel hidup pada 9 minggu setelah tanam; pengamatan hari ke-0 setelah tanam (A) dan pengamatan hari ke-9 minggu setelah tanam.

Hasil pengamatan uji sterilisasi terhadap persentase eksplan hidup pada tabel 2 menunjukkan bahwa perlakuan (C) penggunaan  $H_2O_2$  dengan konsentrasi 10% selama 10 menit mampu menekan terjadinya kontaminasi baik jamur maupun bakteri dan menekan terjadinya *browning* dan memberikan persentase eksplan hidup sebesar 100%. Sementara pada perlakuan (B) dengan konsentrasi  $H_2O_2$  5% selama 15 menit merupakan persentase eksplan hidup terendah sebesar 33,33%.

Penggunaan  $H_2O_2$  pada konsentrasi tinggi diduga mampu masuk ke dalam eksplan endosperm kepel, sehingga sumber kontaminasi baik internal maupun eksternal dapat diminimalisir. Disamping itu, perlakuan  $H_2O_2$  10% dan lama perendaman 10 menit juga mampu menekan terjadinya *browning* dengan persentase *browning* sebesar 0%. Diduga pada konsentrasi  $H_2O_2$  10% dapat mencegah senyawa fenol keluar dari eksplan yang diakibatkan pelukaan. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi  $H_2O_2$  yang cukup pekat mampu melapisi eksplan endosperm sehingga tidak terjadi proses oksidasi. Disamping itu proses perendaman eksplan selama 10 menit diduga mampu mengeluarkan senyawa fenol yang keluar dari eksplan sehingga dapat mencegah terjadinya *browning*. Perendaman yang lama sama halnya dengan pembilasan yang dilakukan terus menerus untuk menghilangkan senyawa fenol yang terdapat pada eksplan (Budiawan, 2010). Sesuai dengan Santoso dan Nursandi (2004) untuk mengatasi masalah *browning* pada eksplan dapat dilakukan dengan cara mengelurkan senyawa fenol dengan melakukan pembilasan terus-menerus dengan air steril.

Keberhasilan kultur *in vitro* endosperm dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya penyertaan zigot embrio dan umur endosperm yang dikulturkan (Sukanto, 2010). Menurut Tao *et al.*, (2009) penentuan umur endosperm saat dikulturkan merupakan faktor kritis terhadap respon pertumbuhannya. Jaringan endosperm yang terlalu muda ataupun terlalu tua akan melampaui fase meristematis sehingga tidak memiliki respon jika dikulturkan.

Berdasarkan beberapa penelitian yang sudah dilakukan melaporkan bahwa kultur endosperm dapat berhasil jika ada penyertaan embrio pada kultur endosperm *Croton*, *Ricinus* dan *Putranjiva* (Srivastava, 1982 dalam Sukanto, 2010) sedangkan menurut Zhao, (1988) dalam Sukanto (2010) melaporkan bahwa kultur endosperm ada yang berhasil tanpa penyertaan embrio yaitu pada tanaman *Citrus grandis* dan *C. sinensis*. Menurut Lakhmi (1987) dalam Sukanto (2010) kultur endosperm cendana dapat tumbuh dengan penyertaan embrio maupun tidak dengan penyertaan embrio. Uji sterilisasi dengan menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 10 menit merupakan metode sterilisasi yang optimum dalam sterilisasi eksplan endosperm kepel ditunjukkan dengan persentase eksplan kontaminasi 0%, persentase *browning* 0% dan persentase eksplan hidup terbesar 100%.