

**PENGARUH PENGGUNAAN HIDROGEN PEROKSIDA (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) PADA  
STERILISASI ENDOSPERM KEPEL (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F. & Th.)  
(*The Effect Of Use Of Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) In Kepel Endosperm Sterilization  
(Stelechocarpus Burahol (Bl.) Hook F. & Th.)*)**

Irfan Aris  
Etty Handayani/ Innaka Ageng Rineksane  
Program studi Agroteknologi Fakultas Pertanian UMY

**INTISARI**

Kepel atau burahol (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F. & Th.) merupakan tanaman yang menjadi identitas Daerah Istimewa Yogyakarta. Keberadaan tanaman kepel pada saat ini sangat sulit ditemui, oleh karena itu tanaman ini termasuk dalam kategori tanaman CD (*Conservation Dependent*). Sulitnya pengadaan bibit tanaman kepel menjadi hambatan dalam melakukan budidaya, salah satu alternatif untuk menghasilkan bibit yang berkualitas yaitu digunakan kultur *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penggunaan hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) untuk optimasi sterilisasi eksplan endosperm kepel. Rancangan penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan rancangan percobaan faktor tunggal yang terdiri dari 6 perlakuan yaitu konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5%, 10% dan 15% selama 10 menit dan 15 menit. Penggunaan hidrogen peroksida sebagai bahan sterilisasi mampu meminimalisir terjadinya kontaminasi dan *browning* pada eksplan endosperm kepel. Penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% selama 10 menit menunjukkan hasil yang optimum pada sterilisasi endosperm dengan menghasilkan persentase kontaminasi 0%, persentase *browning* 0% dan persentase eksplan hidup 100%.

Kata kunci: Tanaman Burahol, Kultur Jaringan, Keping Lembaga, Dioksidan.

**ABSTRACT**

*Kepel or burahol (Stelechocarpus burahol (Bl.) Hook F. & Th.) is the identity flora of the Special Region of Yogyakarta. The existence of kepel plants at this time is very difficult to find, therefore this plant belongs to the category of CD (Conservation Dependent). The difficulty of procuring kepel seedlings is an obstacle in conducting cultivation, one of the alternatives to produce quality seeds is in vitro culture. This study aims to determine the use of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for optimization of endosperm explant sterilization kepel. The design of this study was a Completely Randomized Design (RAL) using a single factor trial design consisting of 6 treatments namely H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations of 5%, 10% and 15% for 10 minutes and 15 minutes. The use of hydrogen peroxide as a sterilizing agent can minimize the replacement of contamination and the formation of explants in the endosperm kepel. The use of 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 minutes showed the optimum results in endosperm sterilization by producing a percentage of 0% contamination, 0% browning percentage and explants percentage 100%.*

*Keywords: Burahol Plants, Plant Tissue Isolation Method, Instution Chip, Antioksidan.*

**I. PENDAHULUAN**

Kepel atau burahol (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F. & Th.) merupakan buah yang menjadi identitas Daerah Istimewa Yogyakarta. Di daerah Jawa buah kepel menjadi kegemaran para putri kerato, hal ini dikarenakan selain memiliki nilai filosofi sebagai perlambangan kesatuan dan keutuhan mental dan fisik, buah kepel juga dipercaya memiliki berbagai khasiat bagi tubuh. Buah kepel dipercaya dapat dimanfaatkan sebagai pengharum bau badan, bau nafas, radang ginjal dan peluruh air seni (Adila, 2011).

Daging buah kepel memiliki kandungan flavonoid dan saponin, yang diketahui mempunyai manfaat sebagai antimikroba, antiinflamasi, antivirus dan antioksidan (Lenny

dan Sofia, 2006). Senyawa lain yang terkandung dalam buah kepel yaitu senyawa bioaktif seperti *cyclooxygenase-2 inhibitor*, *hyperuricemis*, zat sitotoksik anti kanker, deodoran oral, dan senyawa phytoestrogen yang terdapat pada buah, biji, bunga, daun dan kulit batang (Retno dkk., 2015).

Pengetahuan masyarakat yang sangat terbatas pada waktu yang lalu mengenai potensi kepel menyebabkan banyak orang yang tidak menanam karena dianggap mempunyai nilai ekonomis yang rendah. Pada saat ini banyak masyarakat yang sudah tidak mengenal lagi mengenai tanaman kepel karena sudah jarang ditemui keberadaannya. Menurut Haryanto (2012), keberadaan tanaman kepel pada saat ini sangat sulit ditemui, oleh karena itu tanaman ini termasuk dalam kategori tanaman CD (*Conservation Dependent*) dan apabila tidak dilakukan tindakan konservasi maka statusnya menjadi rawan (*vulnerable*). Kurangnya perhatian masyarakat terhadap tanaman kepel disebabkan karena pertumbuhan tanaman kepel yang relatif lambat, sehingga jarang dikembangkan sebagai usaha agribisnis. Salah satu upaya dalam melestarikan tanaman kepel adalah dengan melakukan penanaman tanaman tersebut pada berbagai tempat. Perlunya pengadaan bibit merupakan salah satu faktor yang penting untuk mendukung pelestarian tanaman kepel.

Budidaya tanaman kepel dengan menggunakan biji masih memiliki banyak kendala salah satunya yaitu biji yang sulit berkecambah sehingga menyebabkan proses regenerasi kepel berlangsung lambat. Peningkatan teknik budidaya buah kepel dapat dilakukan secara kultur *in vitro* karena mampu memberikan peluang besar untuk menghasilkan jumlah bibit tanaman yang banyak dalam waktu yang relatif singkat. Perbanyak tanaman secara kultur *in vitro* juga mampu menghasilkan bibit yang bermutu, sifatnya identik dengan induknya, seragam, produktivitasnya lebih tinggi, masa non produktif lebih singkat dan dapat dilakukan sepanjang waktu (Toruan-Mathius *et al.*, 2005; Suratman dkk., 2013).

Kultur *in vitro* merupakan suatu metode mengisolasi bagian tanaman seperti organ, jaringan dan sel serta menumbuhkannya menjadi tanaman utuh dalam media agar dengan kondisi lingkungan yang aseptik. Keberhasilan dalam kultur *in vitro* sangat dipengaruhi oleh media yang digunakan seperti sumber eksplan, unsur hara makro dan mikro, vitamin, zat pengatur tumbuh, karbohidrat, asam amino, bahan pemat media, peralatan dan ruang kerja yang steril. Respon pertumbuhan eksplan pada kultur *in vitro* juga tergantung pada jenis tanaman yang dikulturkan (George dan Sherington, 1984; Suratman dkk., 2013).

Dalam perbanyak tanaman secara kultur *in vitro* tingginya tingkat kontaminasi merupakan salah satu faktor yang menjadi kendala. Untuk meminimalisir tingkat kontaminasi perlu dilakukan sterilisasi eksplan, alat, media dan kondisi lingkungan kerja yang steril. Kegiatan sterilisasi eksplan bertujuan untuk mencegah mikroorganisme yang terbawa saat pengambilan eksplan sehingga tidak menimbulkan kontaminasi dan menghambat pertumbuhan eksplan menjadi tanaman utuh. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu secara fisik dan kimia. Sterilisasi secara fisik melalui suhu, radiasi dan penyaringan, pembakaran dan tekanan. Secara kimia sterilisasi dapat melalui perubahan komposisi molekul misalnya alkohol, NaOCl, klor, iodium, etilen oksida dan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Farooq *et al.*, (2002) penggunaan 12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan 15 menit waktu perendaman mampu mencegah kontaminasi pada permukaan eksplan biji srikaya sebanyak 50% dan sebagian besar berubah menjadi hitam karena mengalami toksisitas. Pada penelitian yang akan dilakukan penggunaan senyawa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diharapkan dapat memperbaiki kondisi aseptik pada eksplan endosperm kepel sehingga mampu meminimalisir terjadinya kontaminasi yang diakibatkan oleh bakteri dan jamur. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untuk optimasi sterilisasi eksplan endosperm kepel.

### A. Latar Belakang

### B. Perumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebagai bahan sterilisasi endosperm kepel?
2. Berapakah konsentrasi dan lama perendaman yang optimum untuk mencegah kontaminasi endosperm kepel?

### C. Tujuan

1. Mengkaji pengaruh penggunaan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sebagai bahan sterilisasi eksplan endosperm kepel.
2. Menentukan konsentrasi dan lama perendaman yang optimum untuk mencegah kontaminasi endosperm kepel.

## II. BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium kultur *in vitro* Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juli - November 2018. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksplan endosperm kepel: medium Murashige and Skoog (MS), BAP, 2,4-D, sukrosa, agar, stok makro, stok mikro, vitamin, myoinositol, alkohol 70%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aquades steril, deterjen 5%, fungisida, bakterisida dan betadin. Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: *dissecting kits*, petridish, botol kultur, erlenmayer, autoklaf, *laminar air flow* (LAF), pH stik, aluminium foil, kertas payung, dan *hot plate magnetic stirrer*.

Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan metode eksperimen faktor tunggal terdiri dari 6 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Masing-masing perlakuan diulang 3 kali dengan masing-masing ulangan terdiri dari 3 sampel sehingga total penelitian terdapat 54 unit. Sterilisasi endosperm kepel dilakukan dengan 2 tahap percobaan. Adapun perlakuannya sebagai berikut; Sterilisasi tahap 1: A = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% + 10 menit, B = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% + 10 menit, C = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% + 10 menit, D = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1% + 15 menit, E = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% + 15 menit dan F = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% + 15 menit. Sterilisasi tahap 2: A = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% + 10 menit, B = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% + 10 menit, C = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% + 10 menit, D = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5% + 15 menit, E = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% + 15 menit dan F = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15% + 15 menit.

## III. 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*.

Perbanyak 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 (laboratorium) 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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

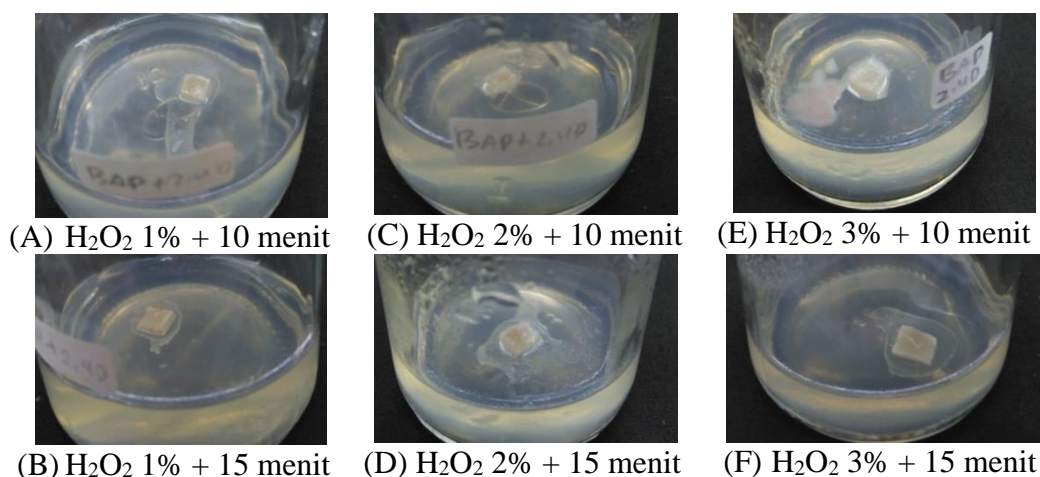
#### 1. Persentase kontaminasi

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.

## 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  $H_2O_2$  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.

## 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).

## 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 konsentrasi 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.

## Sterilisasi Tahap 2

Pada sterilisasi tahap ke-2 dilakukan perbaikan sterilisasi dari teknik sterilisasi yang sudah dilakukan pada percobaan sebelumnya. Konsentrasi  $H_2O_2$  yang digunakan pada percobaan ke-2 yaitu  $H_2O_2$  5%, 10%, dan 15% serta lama perendaman 10 menit dan 15 menit, hal ini disebabkan penggunaan  $H_2O_2$  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

Hasil pengamatan pada tabel 2 menunjukkan bahwa eksplan endosperm kepel pada semua perlakuan tidak mengalami kontaminasi. Diduga penambahan konsentrasi dan lama perendaman H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*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.

## 2. Persentase Eksplan *Browning*

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*.



Gambar 2. *Browning* pada eksplan endosperm

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 kontaminasi 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. 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.

## 3. Persentase Eksplan Hidup

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%.





Gambar 3. Eksplan endosperm kepel hidup pada 9 minggu setelah tanam; pengamatan hari ke-0 setelah tanam (A) dan pengamatan hari ke-9 minggu setelah tanam.

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 (Sukamto, 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 Sukamto, 2010) sedangkan menurut Zhou, (1988) dalam Sukamto (2010) melaporkan bahwa kultur endosperm ada yang berhasil tanpa penyertaan embrio yaitu pada tanaman *Citrus grandis* dan *C. sinensis*. Menurut Lakhsmi (1987) dalam Sukamto (2010) kultur endosperm cendana dapat tumbuh dengan penyertaan embrio maupun tidak dengan penyertaan embrio. Uji sterilisasi dengan menggunakan  $H_2O_2$  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%.

#### IV. KESIMPULAN DAN SARAN

##### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan:

1. Penggunaan hidrogen peroksida sebagai bahan sterilisasi mampu meminimalisir terjadinya kontaminasi dan *brwoning* pada eksplan endosperm kepel.
2. Penggunaan  $H_2O_2$  10% selama 10 menit menunjukkan hasil yang optimum pada sterilisasi endosperm dengan menghasilkan persentase kontaminasi 0%, persentase *browning* 0% dan persentase eksplan hidup 100%.

##### Saran

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



## DAFTAR PUSTAKA

- Adila, N. A. P. 2011. Efektivitas Serbuk Buah Kepel (*Stelechocarpus urahol*) Dalam Menurunkan Kadar Amonia, Trimetilamin dan Fenol Pada feses Mencit (*Mus musculus*).  
<http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/53964/B11naa.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Diakses tanggal 12 Januari 2018.
- Achmad, S. 2014. Efektivitas sterilisasi eksplan lapang *Acacia mangium* Willd dalam perbanyak tanaman melalui teknik kultur jaringan. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Budiono, D. P. 2003. Multiplikasi *in vitro* Tunas Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.) pada Berbagai Taraf Konsentrasi Air Kelapa. Jurnal Agronomi, 8 (2):75-80.
- 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.
- George, E.F and P.D Sherington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture : Hand Book and Directory of Comercial Laboratorius. Exegenetics Ltd., England. 709.
- Haryanto, L. 2012. Konservasi Kepel (*Stelechocarpus burahol*): jenis yang telah langka. Mitra Hutan Tanaman 7(1):11-17.
- Hatmi, R. U., Widyayanti, S. dan Sudarmaji. 2014. Potensi Kepel (*Stelechocarpus burahol* [Blume] Hook.F & Th.) Sebagai Sumber Pangan Fungsional.  
<https://anzdoc.com/potensi-kepel-stelechocarpus-burahol-blume-hookf-th-sebagai-.html>. Diakses tanggal 25 November 2018.
- Imanudin. 2016. Pengaruh Penambahan Air Rebusan Kentang (*Solanum tuberosum* L.), BAP dan NAA Terhadap Induksi Tunas Jati Emas (*Cordia subcordata*) Secara *In vitro*. Skripsi.  
<http://repository.umy.ac.id/bitstream/handle/123456789/6525/NASKAH%20PUBLIKASI.pdf?sequence=12&isAllowed=y>. Diakses tanggal 04 Desember 2018.
- Martiansyah, I. Eris D. D., Haris N., dan Taniwiryono D. 2013. Optimasi prosedur sterilisasi permukaan eksplan stek mikro karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg). Menara Perkebunan 81(1), 9-14.
- Nurtjahjaningsih. 2009. Pengaruh media dasar dan zat pengatur tumbuh BAP pada perbanyak mikro *Pinus merkusii*. Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan 3(3):103-116.
- Oyebanji OB, O Nweke, O Odebunmi, NB Galadima MS Idris, UN Nnodi, AS Afolabi & GH Ogbadu (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice and sorghum seeds. *African J Biotech* 8 (20), 5395-5399.
- 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, 27 Mei 2010. Sulawesi Selatan. Komisariat Daerah Sulawesi Selatan.

- Santoso, U. dan F. Nursandi. 2004. Kultur jaringan tanaman. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang Press.
- Sri, H. 2008. Masalah Pencoklatan Pada Kultur Jaringan. *Jurnal Agrobiogen* 4 (2):83-88
- 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.
- Sukanto, L.A. 2010. Kultur in vitro Endosperma Protocol yang Efisien untuk Mendapatkan Tanaman Triploid Secara Langsung, *Jurnal Agro Biogen* 6(2):107-112.
- Suratman, Ari, P., dan Sri, M. 2013. Keefektifan Penggunaan Bahan Sterilisasi Dalam Pengendalian Kontaminasi Eksplan Pada Perbanyakan Tanaman Sirsak (*Annona muricata* L) Secara *In Vitro*. <http://lppm.uns.ac.id/kinerja/files/pemakalah/lppm-pemakalah-2013-13122013214620.pdf>. Diakses tanggal 12 Januari 2018.
- Tao, R., K. Ozawa, M. Tamura, and A. Sugiura. 2009. Dodecaploid Plant Regeneration from Endosperm Culture of Persimmon (*Diospyros kaki* L.). *Acta Hort.* 436, 119–128.
- Yang, Z. 2009. Vegetatif Propagation and Genetic Fingerprinting OF *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus amplifolia*. Florida; Universiti Of Florida. [http://etdcfla.edu/UF/UF0024073/yang\\_z.pdf](http://etdcfla.edu/UF/UF0024073/yang_z.pdf). Diakses tanggal 4 Desember 2018.