

## I. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Botani Kepel

Kepel (*Stelechocarpus burahol* [Bl.] Hook. F. dan Thomson) adalah tanaman yang termasuk ke dalam keluarga *Annonaceae* atau keluarga sirsak-sirsakan. Tumbuhan kepel memiliki ciri khusus yaitu perbungaannya yang *Hemicyclic* atau dengan kata lain berasal dari mahkota yang berbentuk lingkaran dan untuk benang sari dan putiknya memiliki bentuk yang spiral. *Annonaceae* adalah salah satu yang termasuk ke dalam suku dari bangsa *Policarpiceae* yang berarti tumbuhan ini memiliki buah yang banyak. Kepel adalah salah satu tanaman sebagai penciri atau tanaman khas dari Daerah Istimewa Yogyakarta (Haryanto, 2012). Kepel termasuk ke dalam Kingdom Plantae, Filum Magnoliophyta, Kelas Magnoliopsida, Ordo Fabales, Familli Annonaceae, Genus *Stelachocarpus*, Spesies (*Stelechocarpus burahol* [Bl.] Hook. F. dan Thomson).



**a**



**b**

Gambar 1. Botani kepel a) Buah kepel yang menempel pada pohon kepel b) Biji buah kepel yang dibelah

Kepel memiliki pohon yang tegak dan memiliki tinggi mencapai 25 meter. Tanaman kepel ini memiliki warna hijau gelap serta memiliki bentuk lanset atau bulat telur. Daun kepel tidak memiliki bulu dan merotal tipis dengan pangkal daun, yang panjangnya mencapai 1,5 cm. Kepel memiliki bentuk tajuk atau kanopi berbentuk kubah meruncing seperti pohon cemara. Cabang-cabang dari tanaman kepel mendatar, batangnya berwarna coklat dan cenderung hitam dengan ukuran diameter berkisar 40 cm. Bunga kepel muncul pada bagian batang dan merupakan bunga yang berkelamin tunggal. Bunga kepel memiliki warna hijau pada mulanya dan akan berubah menjadi keputih-putihan. Bunga jantan terletak di batang bagian atas dan dibagian cabang-cabangnya. Sementara bunga betinanya terletak hanya berada di pangkal batang serta memiliki diameter mencapai 3 cm. Buah kepel bergerombol dengan jumlah buah antara 1-13 buah. Panjang tangkai dari kepel mencapai 8 cm serta apabila buah yang hampir matang memiliki bentuk yang bulat. Buah kepel yang sudah matang memiliki warna kecoklatan dengan diameter buah 5-6 cm. Bagian buah kepel yang dapat dimakan sebanyak 49% dari bagian keseluruhan buahnya dan dari 27% berat buah segar (Anonim, 1999).

Pembungaan pada kepel terjadi pada bulan September – Oktober dan periode buah kepel yang masak berkisar antara bulan Maret – April, namun pertumbuhan bunganya tidak serempak pada semua pohon. Penyerbukan pada kepel ini dibantu oleh lebah, kadang-kadang dengan bantuan semut dan kupu-kupu (Sunarto, 1992). Selain itu buah kepel juga memiliki fungsi antara lain yaitu sebagai peneduh dan dapat digunakan juga sebagai penghias tanaman. Alasan mengapa kepel dapat digunakan sebagai peneduh yaitu karena pohon nya yang

dapat tumbuh melebar, tumbuh besar, dan rimbun. Tanaman kepel atau burahol ini termasuk tanaman langka dan sangat jarang untuk dibudidayakan karena nilai ekonomisnya yang dianggap kurang menguntungkan apabila dibandingkan dengan buah lainnya.

Pada dasarnya kepel tumbuh liar pada lahan lembap dan dalam, di hutan-hutan sekunder Jawa. Tanaman kepel sendiri dibudidayakan sebagai pohon buah pada ketinggian mencapai 600 mdpl, dan jenis dapat tumbuh baik di sela-sela rumpun bamboo, yang di tempat itu pohon-pohon lahan tidak mampu bersaing. Tanaman kepel umumnya dapat diperbanyak dengan cara mengambil bagian biji yang sudah diambil dari buah matang dan setelahnya disemaikan. Perbanyak kepel selain itu juga sudah pernah dilakukan melalui penyetekan dan pencangkakan, namun tidak berhasil. Benih kepel dibersihkan dengan cara dicuci setelah ini benih dikeringkan dan disimpan di tempat yang teduh. Tahapan sebelum dilakukan penyemaian benih yaitu benih harus diskarifikasi, tetapi untuk proses perkecambahannya harus memerlukan waktu selama beberapa bulan. Sehingga lambat-laun persentase perkecambahannya tinggi. Kepel dalam proses berkecambahannya akan membentuk perkecambahan hipogeal, sehingga akar tunggang pada tanaman kepel akan membengkak dan tidak bercabang untuk beberapa waktu. Pada awalnya benih yang di semai itu tumbuh lambat. Tanaman kepel ada saat semai memiliki daun 3 sampai 5 helai, setelah itu dipindahtanamkan ke dalam pot. Pada saat tingginya mencapai 0,5 sampai 1,0 m bibit dipindahtanamkan ke lapangan dengan jarak tanam 6 sampai 8 meter.

Hasil penelitian perbanyakan kepel menggunakan stek, walaupun stek mampu bertunas, namun tidak dapat membentuk akar. Kajian berikutnya diuji dengan menggunakan hormon perangsang akar IBA (Indol Buteric Acid), namun setelah 3 bulan juga tidak dapat merangsang keluarnya akar (Rahardjo, 2012). Oleh karena itu, perbanyakan kepel dilakukan dengan metode penyambungan (grafting), menggunakan metode sambung pucuk dan sambung samping. Perbanyakan menggunakan metode grafting dapat berhasil. Untuk membibitkan batang bawah memakan waktu cukup lama memakan waktu. Umur bibit tanaman kepel yang dapat digunakan sebagai batang bawah setelah 2 tahun (Rahardjo, 2014).

## **B. Kultur In vitro**

Kultur *in vitro* atau dengan kata lain *tissue culture* merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti sel, sekelompok sel, organ, bagian jaringan, tepung sari, protoplasma, organ, ovary dan sebagainya), jaringan yang selanjutnya akan ditumbuhkan secara individu. Proses ini akan memacu tahap memperbanyak diri akan diregenerasikan atau melalui proses peremajaan kembali untuk menjadi tanaman yang lengkap dan mempunyai sifat yang sama dengan induknya dalam keadaan lingkungan yang aseptik. Selain itu teknik ini juga disebut kultur *in vitro* yang proses nya di kulturkan dalam suatu wadah gelas (Wattimena dkk., 1992). Dasar dari pengembangan kultur *in vitro* merupakan totipotensi. Totipotensi adalah kemampuan suatu sel agar dapat tumbuh dan berkembang menjadi tanaman yang lebih lengkap. Setiap sel akan

mengalami regenerasi menjadi tanaman yang lebih lengkap dan utuh apabila ditempatkan pada kondisi yang sesuai (Kumar dkk., 2011).

Menurut Rodinah dkk (2016), faktor pengambat dari perbanyakan secara kultur *in vitro* atau *tissue culture* ini adalah adanya kontaminasi. Pada proses kultur *in vitro* yang berlangsung, kontaminasi sering terjadi. Kontaminasi yang terjadi pada kultur *in vitro* ini dapat berasal dari eksplan. Eksplan yang terkontaminasi ini dapat berasal dari eksternal maupun internal. Bahan sterilan memiliki sifat toksik yang artinya bahan sterilan ini dapat mematikan jaringan tanaman dan benda hidup lainnya seperti bakteri dan jamur. Dalam menggunakan bahan sterilan ini lama perendaman dan tingkat konsentrasi yang akan digunakan harus betul-betul diperhitungkan, hal ini bertujuan untuk mengurangi resiko yang akan disebabkan pada kematian jaringan (Bhojwani dan Razdan. 1983). Di Negara yang memiliki iklim tropis biasanya kontaminasi adalah salah satu masalah yang dianggap serius, sehingga proses sterilisasi ini dapat dilakukan pada beberapa tahapan kultur *in vitro*. Tahapan sterilan akan tergantung dari kepekaan permukaan serta akan bergantung pada jenis kontamainan dari eksplan yang digunakan. Pada kultur *in vitro* ini tidak ada prosedur standar yang harus dilakukan pada bahan sterilan yang digunakan untuk suatu jenis tanaman yang berasal dari tempat yang berbeda, pada dasarnya setiap eksplan harus melalui percobaan pendahuluan terlebih dahulu untuk mengetahui bahan sterilannya.

Tahapan kultur *in vitro* meliputi multiplikasi, inisiasi, induksi dan perpanjangan akar (pengakaran), serta aklimatisasi. Multiplikasi adalah tahapan perbanyakan eksplan, dengan cara subkultur atau dengan kata lain memindahkan

eksplan kedalam media yang baru. Media baru yang akan digunakan untuk subkultur ini mengandung Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)). Kegiatan subkultur ini dilakukan secara berulang-ulang, yang tujuannya yaitu mempertahankan stok bahan tanaman (eksplan). Selanjutnya yaitu adalah kegiatan inisiasi. Kegiatan inisiasi ini adalah kegiatan yang dimulai dengan persiapan eksplan, sterilisasi eksplan, yang pada akhirnya diharapkan dapat mendapatkan eksplan yang bebas dari mikroorganisme kontaminan. Pengakaran merupakan kegiatan terakhir sebelum planlet dipindahkan ke kondisi luar. Aklimatisasi adalah proses pemindahan/pengadaptasian planlet dari kondisi *in vitro* ke kondisi luar/lapangan (Kumar dkk, 2011). Adapun tahap yang dilakukan pada kultur jaringan yaitu :

### **1. Pembuatan media**

Media merupakan faktor terpenting dalam pelaksanaan kultur *in vitro*. Media yang digunakan biasanya mengandung bahan-bahan pendukung seperti agar, hormon, garam mineral, vitamin, gula dan zat-zat yang diperlukan tanaman untuk tumbuh serta berkembang (zat pengatur tumbuh).

### **2. Inisiasi**

Inisiasi merupakan suatu proses pengambilan eksplan dari bagian tanaman yang akan dikulturkan. Perkembangan dari penerapan teknik jaringan adalah kemungkinan penggunaan kultur sel tanaman untuk memproduksi metabolit sekunder tanaman (Yuliarti, 2010). Kontaminasi sering terjadi pada proses inisiasi, hal ini disebabkan oleh beberapa faktor yaitu :

a. Keadaan Eksplan

Eksplan pada proses inisiasi yang akan ditanam pada media harus terbebas dari kontaminan seperti hama, penyakit, dan mikroorganisme yang tidak menguntungkan untuk tanaman. Umur eksplan yang berasal tanaman juga akan mempengaruhi dalam pertumbuhan. Eksplan yang digunakan pada kultur *in vitro* sebaiknya berada pada umur rata-rata dimana tanaman tersebut tidak terlalu muda dan juga tidak terlalu tua. Apabila tanaman yang akan dijadikan eksplan memiliki umur yang terlalu muda maka kemungkinan untuk eksplan tumbuh dan berkembang akan sangat sulit, hal ini dikarenakan umur eksplan yang terlalu muda mengandung senyawa fenol yang tinggi dan akan mengakibatkan *browning* atau pencoklatan serta lama-kelamaan eksplan akan mengalami kematian. Eksplan tanaman yang berumur tua pun akan sulit untuk tumbuh, karena apabila eksplan yang akan digunakan berumur tua akan berada pada masa matur/pertumbuhan yang lanjut sehingga sifat totipotensi pada sel tersebut sangat sedikit sekali atau bahkan tidak ada. Contohnya pada tanaman manggis, eksplan yang digunakan sebaiknya berumur sekitar 4–5 bulan (Basri, 2009).

b. Sterilisasi Alat dan Bahan

Peralatan dan bahan yang akan digunakan pada kultur *in vitro* harus steril. Adapun alat yang harus steril diantaranya adalah *laminar air flow*, alat-alat, tabung kultur. Pada proses kultur *in vitro* ini akan lebih baik apabila laminar yang akan digunakan sudah dilengkapi dengan *blower*, lampu UV sehingga dapat mensterilkan ruangan dalam laminar. Sebelum penggunaan laminar

pada kultur *in vitro*, sebaiknya laminar disemprot menggunakan alkohol 70% terlebih dahulu. Alat-alat diseksi juga perlu melalui tahapan sterilisasi, karena apabila alat-alat tersebut tidak disterilisasi kemungkinan terjadinya kontaminasi akan besar karena bekas-bekas eksplan ataupun media yang tersisa pada alat-alat diseksi akan menjadi sumber kontaminan. Oleh karena itu alat-alat diseksi juga perlu disterilisasi. Sterilisasi tabung dilakukan menggunakan oven atau *autoclave*.

### **3. Sterilisasi**

Sterilisasi yang dimaksud dalam kegiatan ini adalah bahwa semua alat, bahan, kondisi laboratorium, eksplan, tempat inisiasi dan pekerja harus dalam kondisi aseptis.

### **4. Multiplikasi**

Tahapan multiplikasi dilakukan untuk mendapatkan jumlah planlet yang lebih banyak.

### **5. Pengakaran**

Pengakaran adalah proses yang dilakukan pada tanaman yang bertujuan untuk membentuk akar pada tanaman yang dikulturkan.

### **6. Aklimatisasi**

Aklimatisasi adalah proses pemindahan planlet dari botol kultur ke lapangan. Biasanya planlet terlebih dahulu di tanam di dalam polybag agar planlet beradaptasi dengan lingkungan sebelum dipindahkan ke lapangan.



### C. Sterilisasi Eksplan

Tahap awal kultur *in vitro* yang memiliki peranan penting dalam keberhasilan kultur tersebut adalah sterilisasi bahan tanaman atau eksplan agar terbebas dari kontaminasi. Sterilisasi merupakan penghancuran atau pemusnahan terhadap semua kontaminan. Hal yang terpenting dalam sterilisasi adalah mengkombinasikan antara usaha untuk mendapatkan eksplan yang steril dan menjaga agar jaringan eksplan tidak rusak akibat tingginya konsentrasi desinfektan (Pancaningtyas, 2011:5). Sterilisasi yang dimaksud dalam kegiatan ini adalah bahwa semua alat, bahan, kondisi laboratorium, eksplan, tempat inisiasi dan pekerja harus dalam kondisi aseptis. Pada proses sterilisasi peralatan yang digunakan harus steril adalah *laminar airflow*, abung kultur, dan alat-alatnya. Pada proses kultur *in vitro* ini akan lebih baik apabila laminar yang akan digunakan sudah dilengkapi dengan *blower*, lampu UV sehingga dapat mensterilkan ruangan dalam laminar. Sebelum penggunaan laminar pada kultur *in vitro*, sebaiknya laminar disemprot menggunakan alkohol 70% terlebih dahulu. Alat-alat diseksi juga perlu melalui tahapan sterilisasi, karena apabila alat-alat tersebut tidak disterilisasi kemungkinan terjadinya kontaminasi akan besar karena bekas-bekas eksplan ataupun media yang tersisa pada alat-alat diseksi akan mejadi sumber kontaminan. Oleh karena itu alat-alat diseksi juga perlu disterilisasi. Sterilisasi tabung dilakukan menggunakan oven atau *autoclave*.

Menurut Giarsiana (2016), beberapa sumber kontaminasi mikroorganisme pada sistem kultur *in vitro* disebabkan oleh hal berikut : (1) media yang digunakan, (2) eksplan yang digunakan, baik internal (kontaminan terbawa di

dalam jaringan tanaman), (3) lingkungan kerja yang tidak steril dalam pelaksanaan dan juga faktor penanaman yang dilakukan kurang hati-hati dan kurang teliti, (4) serangga atau hewan kecil yang tidak sengaja masuk pada botol kultur setelah diletakkan di dalam ruangan, (5) eksplan yang terkontaminasi eksternal (kontaminan berada di permukaan eksplan akibat prosedur sterilisasi yang kurang sempurna sebelumnya. Sumber kontaminasi yang paling sulit diatasi atau dihilangkan ialah yang kontaminasi berasal dari eksplan. Oleh sebab itu, dalam memilih suatu metode sterilisasi dan bahan sterilisasi haruslah selektif, dengan prinsip semaksimal mungkin menghilangkan mikroorganisme kontaminan yang tidak diinginkan dengan gangguan sekecil mungkin pada jaringan eksplan.

Sterilisasi eksplan pada kultur *in vitro* dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara kimia dan secara mekanik. Sterilisasi eksplan secara kimia digunakan untuk eksplan yang lunak (jaringan muda) seperti daun, tangkai daun, anther, dan sebagainya sedangkan sterilisasi eksplan secara mekanik digunakan pada eksplan yang memiliki tekstur keras (misalnya tebu, biji salak, dan sebagainya) atau pada eksplan yang berdaging (misalnya wortel, umbi, dan sebagainya), yaitu dengan membakar eksplan tersebut di atas lampu spiritus sebanyak tiga kali (Giarsiana Handoyowati, 2016).

Inisiasi pada kultur *in vitro* yang terbebas dari kontaminasi adalah salah satu langkah yang penting. Eksplan yang berasal dari tanaman lapangan atau eksplan yang dibawa dari lingkungan yang terbuka akan banyak mengandung debu, mengandung kotoran-kotoran dan berbagai kontaminan lainnya seperti cendawan, bakteri maupun spora. Apabila sumber kontaminasi yang terbawa tidak

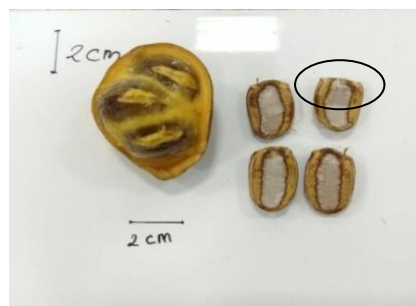
melalui proses penghialangan atau melalui proses pembersihan terlebih dahulu maka dalam media yang mengandung karbohidrat, vitamin dan berbagai mineral akan segera ditumbuhi bakteri maupun cendawan. Eksplan yang sudah ditanam pada media dalam jangka waktu beberapa hari saja akan tertutupi oleh kontaminan tersebut, sehingga lama-lama eksplan yang sudah ditanam akan mati. Bahan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan dapat bermacam-macam, dan akan tergantung pada jenis eksplan yang berasal dari tanaman, bahan tanaman yang akan digunakan di lingkungan tempat eksplan tumbuh, musim, umur tanaman dan kondisi tanaman. Dalam sterilisasi bahan tanam adalah hal terpenting yang harus diperhatikan. Hal ini berarti bahwa sel tanaman dan sumber kontaminan sama-sama benda hidup, sehingga dalam sterilisasi sumber kontaminan dapat mati tetapi sel tanaman yang akan ditanam dapat hidup.

Berbagai macam bahan kimia yang sering digunakan pada proses sterilisasi permukaan eksplan antara lain *natrium hipoklorit*. *Natrium hipoklorit* memiliki nama dagang yang lebih dikenal dikalangan masyarakat yaitu clorox dan bayclin. Konsentrasi dari larutan natrium hipoklorit yang akan digunakan untuk sterilisasi akan tergantung dari kelunakan eksplan. Konsentrasi yang digunakan yaitu dapat berkisar antara 5%-20% dan unuk waktu perendamannya yaitu berkisar antara 5- 10 menit. Selanjutnya bahan sterilan yang dapat digunakan untuk proses sterilisasi adalah mercuri klorit, yang memiliki nama dagang sublimat 0,05%. Penggunaan bahan mercuri klorit yang akan digunakan untuk proses sterilisasi ini harus hati-hati karena memiliki sifat racun. Cara perlakuan dari mercuri klorit untuk sterilisasi ini sama dengan penggunaan clorox, hanya

waktunya lebih pendek karena sublimat bersifat lebih keras dari clorox. Bahan sterilan yang terakhir adalah Alkohol 70%, alkohol sebagai bahan sterilan lebih banyak diperdagangkan dalam bentuk alkohol 95%. Dengan menggunakan bahan sterilan alkohol ini biasanya dapat menyebabkan kematian yang cepat pada jamur dengan menggunakan alkohol 95%.

#### D. Kultur Embrio

Embrio adalah sebuah eukariota diploid multisel dalam tahap paling awal dari perkembangan. Dalam organisme yang berkembang biak secara seksual, ketika satu sel sperma membuahi ovum, hasilnya adalah satu sel yang disebut zigot yang memiliki seluruh DNA dari kedua induknya. Dalam tumbuhan, hewan, dan beberapa protista, zigot akan mulai membelah oleh mitosis untuk menghasilkan organisme multiselular. Hasil dari proses ini disebut embrio (Rindang,2012).



Gambar 2. Bagian Embrio Kepel (Dokumentasi Pribadi)

Dalam kultur embrio salah satu hal penting yang harus dapat dicapai adalah nilai viabilitas embrio yang tinggi. Untuk mendapatkan nilai viabilitas embrio yang tinggi harus memperhatikan beberapa faktor, antara lain: teknik

kultur yang digunakan, medium kultur, umur embrio, kadar CO<sub>2</sub>, suhu inkubasi, lingkungan yang steril dan lain-lain. Berkaitan dengan hal tersebut penelitian tentang teknik kultur yang digunakan, pembuatan media dengan komposisi yang sesuai untuk kebutuhan embrio, pemilihan dan penentuan umur embrio, serta teknik manipulasi lingkungan yang tepat sehingga dapat diperoleh embrio dengan viabilitas yang tinggi perlu dilakukan dalam rangka menghasilkan hewan dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat dan berkualitas. Penggunaan embrio dari buah muda merupakan sumber eksplan yang paling baik, terutama buah yang terbentuk 2-3 bulan setelah penyerbukan terjadi (Sunarno, 2006).

#### **E. Larutan Hidrogen Peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Sejak diproduksi pertama kali tahun 1800 di Inggris, hidrogen peroksida atau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> telah digunakan di seluruh dunia untuk bahan pemutih produk tekstil dan kertas, dipakai pada pemrosesan makanan, bidang pertanian, petrokimia, desinfektan, deterjen, *waste water*, bahkan sebagai komponen oksidan bahan bakar roket. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pertama kali diisolasi melalui reaksi barium peroksida dan asam nitrat oleh Louis Jacques Thenard pada tahun 1818. Proses ini digunakan untuk menghasilkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sejak akhir abad ke-19 sampai pertengahan abad ke-20. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> murni ditemukan pertama kali oleh Richard Wolffenstein pada tahun 1894 melalui destilasi vakum. Nama lainnya adalah dioksida dihidrogen, dihidrogen dioksida, hidrogen dioksida atau dioksidan. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sangat melimpah di alam, terutama terbentuk oleh rangsangan cahaya matahari pada air dan ditemukan pada air hujan dan salju.

Hidrogen peroksida memiliki sifat fisik yaitu berat molekul sebesar 34,0147 g/mol, densitas sebesar 4g/cm<sup>3</sup> (cair), memiliki titik cair -110 °C (262,15K), memiliki titik didih 150,20 °C (423,35 °K), memiliki keasaman (pKa) 11,65, tingkat viskositas 1,245 cP pada suhu 200 °C, dengan penampakan tidak berwarna dan tidak berbau. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> juga adalah larutan oksidan yang lebih kuat dari klorin, klorin dioksida dan kalium permanganate.

Hidrogen peroksida ini dapat menghambat pertumbuhan cendawan dan bakteri dengan cara menghidrolisis sel atau menggumpalkan protein yang terdapat pada protoplasma. Protein yang telah menggumpalkan kehilangan fungsinya, sehingga cendawan dan bakteri akan mengalami kematian. Dibandingkan dengan bahan kimia lainnya, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> merupakan bahan yang ramah lingkungan karena mudah terurai menjadi air dan oksigen (Srivastava dkk., 2010).

## **F. Hipotesis**

Diduga pada penelitian ini, konsentrasi serta lama perendaman yang paling tinggi menunjukkan hasil yang optimum dalam mencegah kontaminasi yaitu pada konsentrasi 15% dengan lama perendaman selama 15 menit. Berdasarkan penelitian pendahuluan, hasilnya menunjukkan bahwa pada konsentrasi dan lama perendaman yang paling tinggi serta paling lama menunjukkan hasil yang optimum untuk mencegah kontaminasi.