

**OPTIMASI STERILISASI EMBRIO DAN ENDOSPERM KEPEL
(*Stelechocarpus burahol*(Bl.) Hook F. & Th.) MENGGUNAKAN SODIUM
HIPOKLORIT (NaOCl) SECARA *IN VITRO*
(*Optimization Sterilization of Embryo and Endosperm Kepele ((Stelechocarpus
burahol*(Bl.) Hook F. & Th.) Using Sodium Hypochlorite (NaOCl) In Vitro)**

**Muhammad Burhanuddin Irsyadi
Etty Handayani/Innaka Ageng Rineksane**

Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian UMY

INTISARI

Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook. F & Th.) merupakan salah satu tanaman buah asli Indonesia yang termasuk tanaman langka. Perbanyakan tanaman kepel secara konvensional membutuhkan waktu lama, sehingga dilakukan upaya perbanyakan melalui kultur *in vitro*. Hingga saat ini metode sterilisasi kepel belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode sterilisasi embrio dan endosperm yang tepat menggunakan Sodium hipoklorit (NaOCl). Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur *In vitro* Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada tahun 2018. Penelitian ini disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal 8 perlakuan yaitu perendaman eksplan menggunakan NaOCl pada eksplan embrio dan endosperm dengan masing-masing perlakuan (EN5%-5', EN5%-10', EN10%-5', EN10%-10', EM5%-5', EM5%-10', EM10%-5' dan EM10%-10').

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan embrio dengan konsentrasi NaOCl 10% selama 5 menit (EM10%-5') merupakan metode sterilisasi yang optimal didukung parameter persentase eksplan hidup tertinggi 88,89%, persentase kontaminasi 0% dan persentase kontaminasi 11,11%, serta persentase berkalus 22,22% dengan diameter kalus paling besar 3,24 mm dengan warna kalus putih dan bertekstur kompak.

Kata kunci : *burahol, kultur jaringan, chlorox, embrio, keping lembaga*

Abstract

Kepel (Stelechocarpus burahol (Bl.) HookF. & Th.) is one of Indonesia's native fruit plants, including rare plants. Conventional propagation of kepel plants takes a long time, propagation is done through tissue culture. Until now the kepel sterilization method has never been done. This study aims to obtain the right method of embryo and endosperm sterilization using Sodium hypochlorite (NaOCl). This research was conducted at the In vitro Culture Laboratory of the Faculty of Agriculture, Muhammadiyah University of Yogyakarta in 2018. This study was compiled using a single completely randomized design (CRD) of 8 treatments, namely immersion of explants using NaOCl in embryonic explants and endosperm with each burn (EN5% -5', EN5% -10', EN10% -5 ', EN10% -10 ', EM5% -5', EM5% -10 ', EM10% -5' and EM10% -10 ').

The results showed that embryo treatment with 10% NaOCl concentration for 5 minutes (EM10% -5 ') was the best sterilization method that

strengthened the percentage parameters of live explants 88,89%, percentage of contamination 0% and percentage of browning 11.11%, and percentage of callus 22.22% with the largest callus diameter of 3.24 mm and color callus of white and has compact texture.

Key words :Burahol, Tissue culture, Chorox, Embrio and Endosperm.

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki kekayaan keanekaragaman hayati yang melimpah. Keanekaragaman tersebut diantaranya terdapat 28.000 jenis tumbuhan yang terdapat di Indonesia. Terdapat 400 jenis tanaman buah-buahan asli Indonesia yang dapat dikonsumsi dan dimanfaatkan (Kosasih, 2016). Salah satu tanaman buah asli Indonesia yaitu kepel.

Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F. & Th.) merupakan salah satu jenis buah-buahan asli Indonesia (Irmanida dkk., 2010). Kepel menjadi tanaman identitas Provinsi Daerah Istimewa Yogyakarta (Haryjanto, 2012) melalui Keputusan Gubernur Kepala No. 385/KPTS/1992 (Kehati, 2017). Kepel merupakan buah favorit para putri Keraton Yogyakarta karena memiliki rasa dan aroma yang lezat serta berkhasiat bagi kesehatan dan kecantikan (Muhammad, 2017).

Dewasa ini pohon kepel mengalami kelangkaan dan sedang menghadapi kepunahan karena jumlah populasi semakin sedikit. Kelangkaan tanaman kepel saat ini termasuk dalam kategori *Conservation Dependent* (CD) yaitu keberadaannya yang sulit ditemui (Haryjanto, 2012). Kelangkaan tersebut disebabkan masyarakat yang takut untuk menanamnya karena kepel merupakan tanaman Keraton Yogyakarta (Alamendah, 2010). Selain itu, buah kepel kurang memiliki nilai jual ekonomi. Hal ini dikarenakan buah kepel memiliki biji yang besar dan bagian buahnya yang dapat dikonsumsi hanya sebesar 49% (Tisnadjadja dkk., 2006). Jika tidak dilakukan tindakan konservasi maka statusnya dapat meningkat satu tahap di atasnya, yaitu rawan (*vulnerable*). Maka, perlu dilakukan perbanyakan pohon kepel sebagai upaya konservasi dan pelestarian tanaman langka Indonesia.

Perbanyakan tanaman kepel secara konvensional masih sulit untuk dilakukan. Hal ini dikarenakan biji kepel memiliki masa dormansi yang lama sekitar 4 – 6 bulan untuk berkecambah secara alami hingga tumbuh tunas. Hal tersebut karena biji kepel memiliki tekstur keras pada bagian kulit dan endosperminya (Isnaeni dan Habibah, 2014), sehingga populasi tanaman tersebut terbatas. Oleh karena itu, perlu dilakukan perbanyakan kepel secara kultur *in vitro* untuk mempercepat produksi bibit dalam jumlah yang banyak.

Santoso dan Nursandi (2002) serta Suratman dkk., (2013) menjelaskan bahwa kultur *in vitro* merupakan teknik budidaya sel, jaringan dan organ tanaman seperti: daun, tunas, bunga, biji, endosperm dan embrio dalam suatu lingkungan yang terkendali dan dalam keadaan aseptis atau bebas mikroorganisme.

Pertumbuhan dari jaringan tersebut melalui pembelahan sel sehingga membentuk individu baru. Perbanyakkan bibit secara *in vitro* dapat menghasilkan jumlah bibit yang lebih banyak dalam waktu yang singkat dan tidak dipengaruhi musim. Selain itu, perbanyakkan secara *in vitro* dapat menghasilkan bibit yang berkualitas, sifatnya sesuai dengan induknya, hasilnya seragam dan produktivitasnya lebih tinggi. Beberapa jenis eksplan yang dapat digunakan untuk kultur *in vitro* yaitu embrio dan endosperm.

Endosperm merupakan massa sel parenkim yang homogen tanpa jaringan pembuluh dan pembelahan yang berada di dalam biji. Endosperm berfungsi untuk memelihara embrio selama pertumbuhan pada fase heterofit dan menjadi sumber cadangan makanan selama pertumbuhan embrio dan perkecambahan biji. Kultur endosperm secara *in vitro* bertujuan untuk mendapatkan tanaman triploid atau buah tanpa biji (Sukamto, 2010). Faktor keberhasilan kultur *in vitro* dengan eksplan endosperm antara lain umur endosperm, penyertaan embrio, pencoklatan (*browning*) dan umur kultur. Menurut Tao *et al* (2009) umur endosperm pada fase meristemik dapat merespon baik bila dikulturkan. Sementara kultur embrio merupakan pengambilan embrio dari biji dalam kondisi aseptik. Kultur embrio dapat dilakukan untuk mengatasi sterilitas dan dormansi biji (Ambarita, 2013). Penggunaan embrio sebagai eksplan untuk kultur embrio somatis (Purnamaningsih, 2002).

Keberhasilan dari kultur *in vitro* juga tergantung dari tingkat kesterilan eksplan. Apabila eksplan tidak steril, maka dapat berdampak pada kontaminasi yang mengakibatkan eksplan tidak tumbuh. Sterilisasi bertujuan untuk menghilangkan mikroba yang terbawa pada eksplan yang menjadi penghambat pertumbuhan eksplan menjadi tanaman utuh (Suratman dkk., 2013). Konsentrasi sterilan, waktu eksplan terpapar sterilan dan urutan penggunaan diupayakan untuk meminimalisir kerusakan eksplan (Roviq dan Wardiyati, 2011).

Hingga saat ini belum diketahui metode sterilisasi pada biji, embrio maupun endosperm yang tepat untuk kultur *in vitro* kepel. Bahan sterilan biasanya berupa desinfektan atau antiseptik. Salah satu desinfektan yang sering digunakan yaitu Sodium hipoklorit (NaOCl). Hipoklorit diketahui sebagai antibakteri yang sangat efektif walaupun dalam konsentrasi yang sangat sedikit (Singh *et al.*, 2011). NaOCl dapat mengendalikan infeksi dan tidak menimbulkan dampak negatif terhadap eksplan dalam waktu yang lama (Badoni dan Cauhan, 2010), akan tetapi metode perendaman menggunakan NaOCl belum diketahui, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang sterilisasi embrio dan endosperm kepel.

Pada penelitian Rineksane *et al.*, (2012) sterilisasi eksplan biji manggis (*Gracinea mangostene*) menggunakan Sodium Hipoklorit (NaOCl) 5% dan 10% selama 5 dan 10 menit tanpa lapisan pelindung untuk pertumbuhan kalus embriogenik menghasilkan tingkat kontaminasi dan *browning* yang rendah. Penelitian Maldonado *et al.* (2013) perbanyakkan biji srikaya (*Annona squamosa* L.) menggunakan biji dari buah yang sudah masak, sterilisasi biji dilakukan dengan cara direndam dalam larutan NaOCl 1% selama 9 menit. Setelah itu biji dicuci dengan alkohol 96% kemudian dicuci tiga kali dengan aquades steril. Sementara pada penelitian Nair *et al.*, (1985) sterilisasi optimal kultur endosperm

srikaya (*Annona squamosa* Linn) dengan menggunakan biji srikaya tua disterilisasi menggunakan larutan merkuri klorida (HgCl_2). Kultur endosperm tersebut bertujuan untuk mendapatkan tanaman triploid atau buah tanpa biji. HgCl_2 merupakan bahan kimia yang bersifat toksik, sehingga perlu dilakukan penggantian bahan sterilan menggunakan NaOCl yang lebih aman.

B. Rumusan Masalah

1. jenis eksplan apakah yang paling optimal untuk perbanyakkan kepel secara *in vitro*?
2. Berapakah konsentrasi NaOCl yang tepat untuk sterilisasi embrio dan endosperm kepel ?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengkaji bahan eksplan yang tepat untuk perbanyakkan tanaman kepel secara *in vitro*.
2. Untuk menentukan metode sterilisasi menggunakan NaOCl yang paling tepat untuk sterilisasi eksplan embrio dan endosperm kepel.

II. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juni – Oktober 2018 di Laboratorium Kultur *In vitro*, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Jl. Lingkar Barat, Taman Tirto, Kasihan, Bantul, D. I. Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan yaitu : endosperm kepel, embrio kepel, NaOCl, medium MS, antiseptik, fungisida, bakterisida, deterjen, sukrosa, agar, spirtus, alkoaho 70%, aquades steril, *aluminium foil*, HCl 1 N dan KOH 1 N. Alat yang digunakan yaitu : timbangan analitik, *glassware*, autoklaf, LAF, pinset, scalpel, pisau, bunsen, sinar UV, cawan petri, pH stik, spatula, mangkuk timbang, kompor, syring dan lampu TL.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan metode eksperimen faktor tunggal yang disusun menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan perendaman bahan eksplan menggunakan larutan NaOCl yang terdiri dari 8 aras :

- 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
- EM5% - 10' = Embrio → NaOCl 5% selama 10 menit
- EM10% - 5' = Embrio → NaOCl 10% selama 5 menit
- EM10% - 10' = Embrio → NaOCl 10% selama 10 menit

Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga didapat 24 unit percobaan. Setiap unit terdiri dari 3 sampel, sehingga terdapat 72 sampel percobaan.

F. Analisa Data

Data yang telah didapatkan dari hasil pengamatan pada parameter persentase eksplan hidup, persentase *browning*, dan persentase kontaminasi dianalisis dengan analisis sidik ragam *Analisis of Variance* (ANOVA) pada jenjang nyata $\alpha = 5\%$. Apabila terdapat beda nyata antar perlakuan yang diujicobakan dilakukan uji lanjut menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) taraf $\alpha = 5\%$. Hasil tersebut disajikan dalam bentuk tabel. Parameter lainnya dianalisis dan disajikan dalam bentuk histogram dan tabel.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Optimasi Sterilisasi

Optimasi sterilisasi bertujuan untuk menentukan metode sterilisasi yang optimal pada eksplan embrio atau endosperm kepel secara *in vitro*. Parameter yang digunakan pada optimasi sterilisasi yaitu persentase eksplan hidup, kontaminasi dan *browning*. Hasil pengamatan disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Optimasi sterilisasi embrio dan endosperm kepel menggunakan NaOCl terhadap persentase eksplan hidup, kontaminasi dan *browning* 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 1) 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.

Berdasarkan hasil pengamatan (Tabel 1), perlakuan eksplan endosperm dan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 10 menit dan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 5 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 dan *browning*. 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.

Sementara 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 juga tidak mengalami pertumbuhan.

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 1), perendaman eksplan embrio dan endosperm kepel dengan 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.

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.

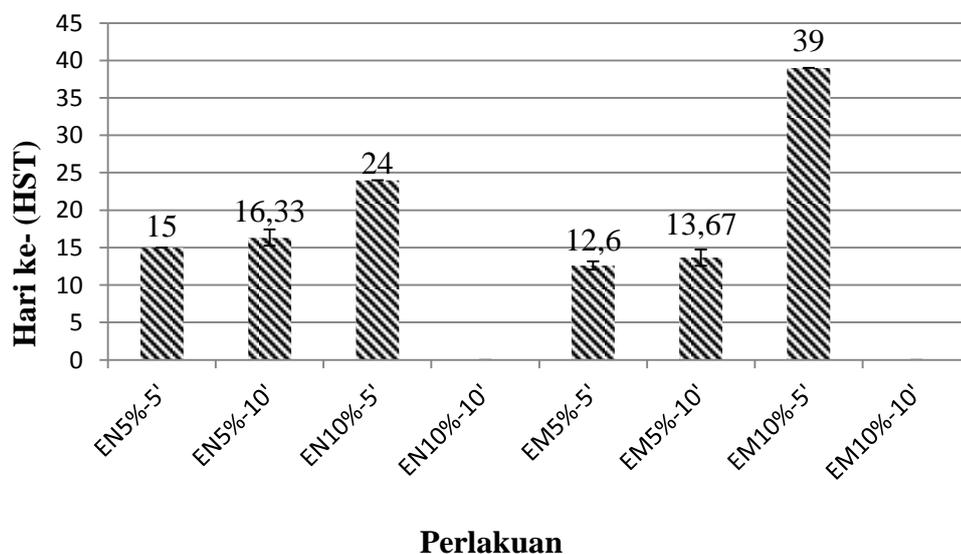
Hasil sidik ragam pada persentase browning dengan taraf kesalahan 5% (Tabel 1) menunjukkan bahwa terdapat beda nyata antar perlakuan. Hal ini menunjukkan sterilisasi eksplan embrio dan endosperm kepel dengan berbagai konsentrasi NaOCl memberikan pengaruh nyata terhadap persentase eksplan browning pada hari ke-60 setelah tanam.

Berdasarkan hasil pengamatan (Tabel 1), perlakuan eksplan endosperm NaOCl 10% selama 10 menit dan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 10 menit memberikan hasil persentase *browning* terendah (0%). Perolehan persentase eksplan *browning* tertinggi (88,89%) terdapat pada perlakuan endosperm yang disterilisasi menggunakan NaOCl konsentrasi 5% selama 5 menit. 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%).

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*.

3. Saat Eksplan *Browning*

Saat eksplan *browning* merupakan indikator untuk mengetahui kecepatan *browning* pada eksplan sejak awal penanaman hingga eksplan *browning*.



Gambar 1. Rerata waktu eksplan saat *browning*.

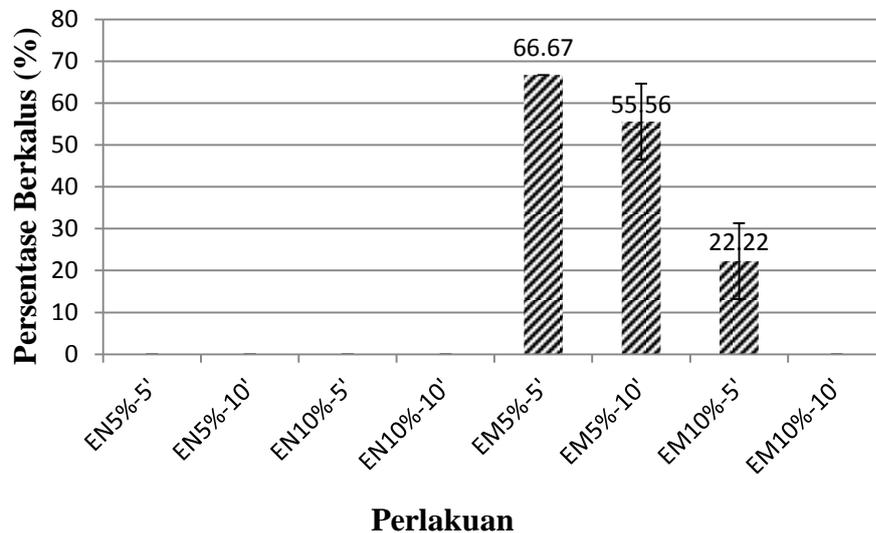
Berdasarkan histogram, perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 5 menit eksplan mulai *browning* pada hari ke-39 HST. Hal ini menunjukkan bahwa NaOCl dengan konsentrasi 10% dapat menghambat proses *browning* pada eksplan. Sementara, waktu *browning* tercepat pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 5% selama 5 menit dan 10 menit pada hari ke 12,6 dan 13,67 HST. Konsentrasi NaOCl 5% belum dapat menghambat proses *browning*.

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 2.



Gambar 2. Rerata persentase eksplan berkalus

Berdasarkan histogram (Gambar 2), dapat diketahui bahwa hanya terdapat 3 dari 8 perlakuan yang mengalami pertumbuhan kalus. Hal ini dikarenakan terdapat eksplan yang mengalami stagnasi, sehingga eksplan tidak mengalami pertumbuhan hingga umur 60 HST. Perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 5% selama 5 menit memperoleh persentase eksplan berkalus paling tinggi (66,67%), sedangkan

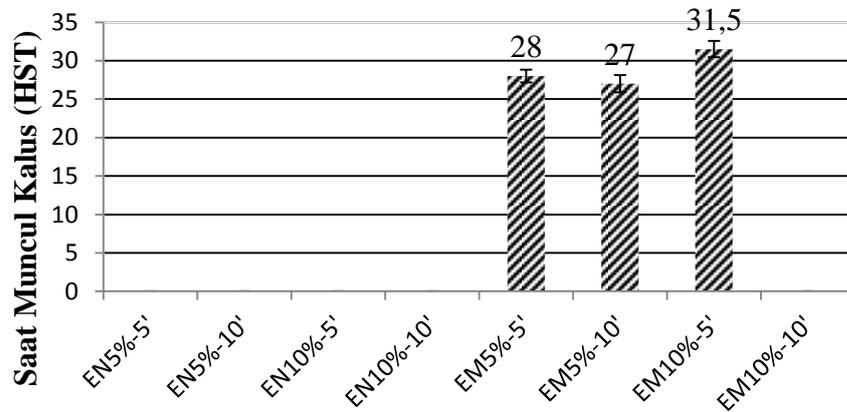
pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 5% selama 10 menit, persentase eksplan berkalus sebesar 55,56%. Sementara itu, persentase eksplan berkalus terendah (22,22%) pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 5 menit. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan embrio lebih tahan terhadap pemaparan bahan kimia dibanding dengan endosperm pada tahap sterilisasi. Selain itu, respon pertumbuhan kalus eksplan embrio lebih tinggi dibanding dengan endosperm. 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. 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.

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*.



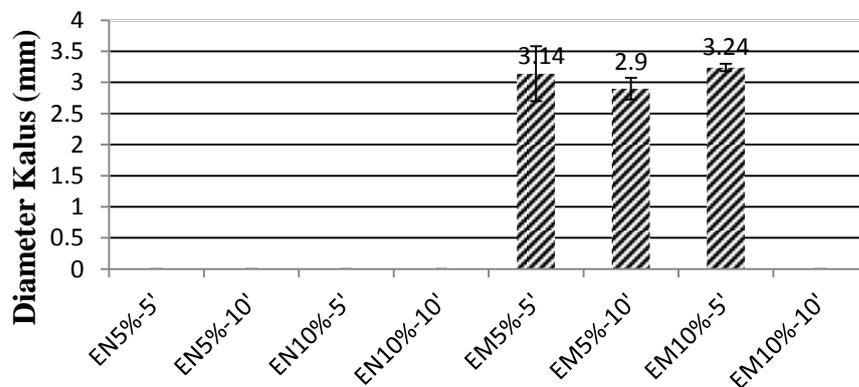
Perlakuan

Gambar 3. Rerata waktu eksplan muncul kalus

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 kerusakan jaringan, sehingga dapat menghambat pembelahan sel. Kecepatan muncul kalus yang tidak jauh berbeda dikarenakan penambahan ZPT pada medium dalam jumlah yang sama. Menurut Ariani, dkk., (2016), waktu terbentuknya kalus cenderung lebih cepat ketika konsentrasi 2,4-D lebih tinggi dibanding BAP.

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.



Perlakuan

Gambar 4. Rerata diameter kalus

Berdasarkan histogram, rerata diameter kalus pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 10% selama 5 menit cenderung paling besar (3,24 mm) dibanding dengan 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.

Syahid, dkk., (2010) menjelaskan 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.

4. Warna dan Tekstur Kalus

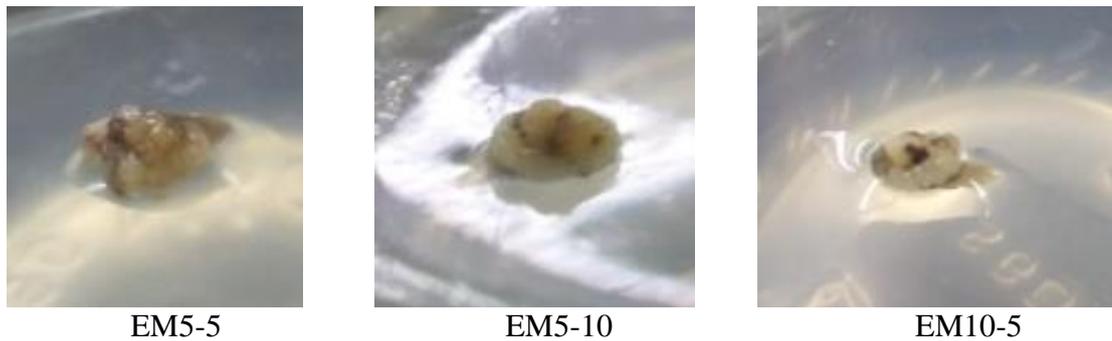
Warna kalus merupakan salah satu indikator untuk mengetahui perkembangan kalus melalui kenampakan visul serta menjadi indikator bahwa jaringan pada eksplan masih aktif untuk membelah atau telah mati.

Tabel 2. Pengaruh sterilisasi NaOCl terhadap warna dan terkstur 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 2) ,menunjukkan bahwa rata-rata warna kalus berwarna putih kekuningan dari 3 perlakuan yang tumbuh kalus. Kalus pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 5% selama 5 menit dan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 5% selama 10 menit memiliki rata-rata warna kalus kekuningan, sedangkan kalus pada perlakuan eksplan embrio yang disterilisasi NaOCl 10% selama 5 menit kalus berwarna putih (Gambar 5). 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 5. Kalus pada eksplan embrio kepel 60 HST.

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. 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 2), 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). Apriliyastuti (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.

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Embrio kepel merupakan eksplan yang paling baik untuk kultur *in vitro* dibandingkan dengan eksplan endosperm kepel.
2. Metode sterilisasi yang optimal pada perlakuan penggunaan eksplan embrio yang disterilisasi menggunakan NaOCl 10% selama 5 menit yang didukung oleh persentase eksplan hidup (88,89%), persentase kontaminasi (0%) dan persentase *browning* (11,11%), serta persentase berkalus (22,22%) dengan diameter kalus 3,24 mm berwarna putih dan bertekstur kompak.

B. Saran

1. Perlu dilakukan penambahan bahan anti *browning* pada kultur embrio kepel untuk menurunkan tingkat *browning* pada eksplan.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penambahan imbalanced berbagai jenis zat pengatur tumbuh pada media untuk mengetahui pertumbuhan kalus eksplan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarita, K. 2013. Kultur Embrio. <https://blog.ub.ac.id/kristyaphinenara/2013/11/16/kultur-embrio/>. Diakses tanggal 16 Januari 2018.
- Andaryani, S. 2010. Kajian Penggunaan Berbagai Konsentrasi Bap Dan 2,4-D Terhadap Induksi Kalus Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) Secara *In vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret. Surakarta. <https://eprints.uns.ac.id/4645/>. Diakses tanggal 28 Februari 2018.
- Badoni, A. and J. S. Chauhan. 2010. *In vitro* Sterilization Protocol for Micropropagation of *Solanum tuberosum* cv. 'Kufri Hirnalini'. *Academia Arena*. 2 (4)
- Irmanida, B., Latifah, Edy dan Tohr. 2010. Potency Of Kepel (*Stelechocarpus burahol*) As Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *Jurnal Tumbuhan Obat Indonesia*. 3 (2).
- Isnaeni dan Habibah. 2014. Efektivitas Skarifikasi dan Suhu Perendakan Terhadap Perkecambahan Biji Kepel (*Stelechocarpus burahol* Blume Hook. F dan Thompson) Secara *In vitro* dan Ex Vitro. *Jurnal MIPA*. 37 (2). Hal. 105-114.
- Mahadi, I. Syafi'i dan Sari. 2016. Induksi Kalus Jeruk Kasturi (*Citrus microcarpa*) Menggunakan Hormon 2,4-D dan BAP dengan Metode *in vitro*. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*. 21 (2). Hal 84-89.
- Maldonado, F. E. M., Diego and Stanislav. 2013. Sugar Apple (*Annona squamosa* L., *Annonaceae*) Seed Germination : Morphological and Anatomical Changes. *Agronomia Colombiana*. 31 (2).

- Marlina N. 2004. Teknik Modifikasi Media *Murashige* Dan *Skoog* (MS) Untuk Konservasi *In vitro* Mawar (*Rossa Spp.*). Buletin Teknik Pertanian. 9 (1).
- Nair, S., Shirgukar, Mascarenhas. 1986. *Studies on endosperm culture of Annona squamosal* Linn. Plant Cell Report. (5). P 132-135.
- Nurfauziah. 2004. Kajian Dan Lama Perendaman Dalam Antibiotic Pada Sterilisasi Pucuk Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Secara Kultur *In vitro*. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Yogyakarta.
- Purnamaningsih, R., 2002. Regenerasi Tanaman Melalui Embriogenesis Somatik Dan Beberapa Gen Yang Mengendalikannya. Jurnal Buletin AgroBio. 5 (2). Hal 51 – 58.
- Santoso, U., Nursandi. 2002. Kultur Jaringan Tanaman. UMM Perss. Malang.
- Singh, V, A. Tyagi, P. K. clrauhan, P. Kumari and s. Kaushal. 2011. *Idenrification And Prevention Of Bacterial Contimination On Explant Used In Plant Tissue Culture Labs*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 3 (4).
- Siswanto, H., 2006. Sterilisasi Dan Induksi Kalus Daun Kelapa Sawit Secara *In vitro*. Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Yogyakarta.
- Sowa, M. T., Figas A. 2011. *Optimization Of The Processes Of Sterilization And Micropropagation Of Cup Plant (Silphium Perfoliatum L.) From Apical Explants Of Seedlings In In vitro Cultures*. Journal ACTA Agrobotanica. 64 (4). Page 3 – 10.
- Sukamto A. 2010. Kultur *In vitro* Endosperma, Protokol yang Efisien untuk Mendapatkan Tanaman Triploid secara Langsung. Jurnal AgroBiogen. 6. (2). Hal 107-112.
- Suratman, Pitoyo dan Mulyani. 2013. Keefektifan Penggunaan Bahan Sterilisasi Dalam Pengendalian Kontaminasi Eksplan Pada Perbanyakan Tanaman Sirsak (*Annona muricata* L.) Secara *In vitro*. Biologi FMIPA. UNS. Surakarta.
- Tisnadjadja, D., Edward, Silvia dan Partomuan. 2006. Pengkajian Burahol (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook & Thomson) sebagai Buah yang Memiliki Kandungan Senyawa Antioksidan. Jurnal Biodiversitas. 7 (2). Hal 199-202.