

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F. & Th.)

Kepel atau burahol merupakan salah satu jenis buah langka yang dapat ditemukan di Indonesia dan sampai saat ini belum dibudidayakan. Di Indonesia tanaman kepel dapat ditemukan di Daerah Istimewa Yogyakarta karena termasuk salah satu jenis buah yang telah ditetapkan menjadi salah satu tanaman penciri daerah tersebut.

Taksonomi tanaman kepel secara klasifikasi ilmiah adalah sebagai berikut: Kingdom Plantae, Divisio Tracheophyta, Class Magnoliopsida, Sub classis Magnolidae, Ord Magnoliales, Famili Annonaceae, Genus *Stelechocarpus* dan Spesies *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook F. & Th. (Simpson, 2006). Tanaman kepel memiliki beberapa nama lain seperti cindul (jawa), burahol (Indonesia) dan turalak (Sunda).



Gambar 1. Tanaman Kepel (Putri, 2018)

Tanaman kepel berupa pohon yang bisa mencapai tinggi lebih dari 25 meter. Batang tanaman lurus berwarna coklat tua dengan diameter dapat mencapai 40 cm dan memiliki cabang mendatar. Jenis perakaran dari tanaman kepel berupa akar tunggang. Tanaman kepel memiliki daun berbentuk lanset fusiform, warna hijau gelap, merontal tipis dengan ukuran (12-27) cm x (5-9) cm, panjang tangkai daunnya dapat mencapai 1,5 cm dan pada saat muda berwarna kemerahan (Shiddiqi *et al.*, 2008). Tanaman kepel memiliki ciri bunga yang berumah satu berkelamin tunggal dengan bunga jantan pada batang sebelah atas dan di cabang-cabang yang lebih tua, berkumpul sebanyak 8-16 kuntum dan diameter 1 cm. Sedangkan bunga betina berada di pangkal batang dengan diameter 3 cm. Bunga tanaman kepel berwarna hijau yang kemudian berubah menjadi keputih-putihan.

Buah kepel berbentuk bulat, pangkalnya runcing dengan warna coklat keabu-abuan, diameter buah 5-6 cm, tumbuh pada bagian batang, memiliki cita rasa yang manis, beraroma harum dan daging buah berwarna kuning kecoklatan. Buah kepel bergerombol antara 1-13 buah. Buah kepel yang sudah matang bentuknya hampir bulat, berwarna kecoklat coklatan. Buah kepel dianggap matang jika digores kulit buahnya berwarna kuning atau coklat muda dan mudah ketika dipetik. Biji pada buah kepel berbentuk menjorong, bulat gilig dan datar cembung, berukuran besar, berwarna coklat tua kehitaman dan dalam satu buah terdapat 3-4 biji. Biji buah kepel memiliki kulit keras yang menyerupai tempurung dengan permukaan luar kasar berlekuk. Kulit biji yang keras berfungsi untuk melindungi embrio dan kotiledon (Putri *et al.*, 2011).

Beberapa bagian pohon kepel mempunyai nilai manfaat yang besar diantaranya buah, biji, daun dan kayu. Buah kepel dapat dimanfaatkan sebagai deodorant oral yang dapat mengurangi bau pada tubuh dan dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan. Daging buah kepel dipercaya dapat memperlancar air kencing dan mencegah inflamasi ginjal. Biji buah kepel mengandung saponin, flavoid, polifenol serta alkaloid. Ekstrak etanol daun kepel dan ekstrak heksan memiliki potensi manfaat sebagai penurun kadar asam urat darah. Kandungan zat sitoksik pada daun kepel juga dapat dimanfaatkan untuk menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker. Kayu dari tanaman buah kepel dapat dimanfaatkan sebagai bahan industri dan bahan bangunan yang dapat bertahan lebih dari 50 tahun.

Budidaya tanaman kepel dapat dilakukan dengan menggunakan biji tetapi membutuhkan waktu yang lama, hal ini disebabkan cangkang pada biji buah kepel sangat tebal sehingga membutuhkan waktu yang lama untuk berkecambah. Usaha budidaya kepel dengan menggunakan teknik stek, tempel dan okulasi masih sulit untuk dilaksanakan. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan pada perbanyakan kepel dengan menggunakan stek pucuk, tengah dan bawah dengan perlakuan tanpa ZPT, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm IBA pasta tidak mampu menghasilkan bibit tanaman kepel, atau mengalami kegagalan (Rahardjo dkk., 2012). Salah satu teknologi perbanyakan *in vitro* merupakan solusi yang dapat memecahkan masalah dalam mendapatkan bibit kepel dalam jumlah banyak, seragam dan tidak tergantung musim.

B. Kultur In Vitro

Kultur *in vitro* merupakan teknik budidaya jaringan atau sel tanaman menjadi tanaman utuh dan mempunyai sifat yang sama dengan induknya. Menurut Gunawan (1992) kultur *in vitro* adalah metode mengisolasi bagian tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ dan menumbuhkannya dalam media yang tepat dan kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap.

Keuntungan dari perbanyak tanaman dengan metode kultur *in vitro* mampu memberi peluang besar untuk menghasilkan bibit tanaman dalam jumlah yang banyak, serentak, bebas dari penyakit dan dalam waktu singkat. Selain itu metode perbanyak tanaman dengan kultur *in vitro* dapat dilakukan sepanjang waktu, tidak dipengaruhi oleh musim. Faktor keberhasilan dalam kultur *in vitro* sangat bergantung pada eksplan dan media tanam atau media tumbuh yang digunakan. Media tumbuh yang digunakan dalam kultur *in vitro* terdiri dari zat pengatur tumbuh (ZPT), vitamin, sumber karbohidrat, garam-garam mineral dan senyawa senyawa nitrogen organik. Sementara eksplan merupakan bagian tanaman yang digunakan sebagai bahan inisiasi kultur seperti daun, batang, tunas, bunga, dan biji.

Menurut (Lusi, 2009 dalam Nur, 2013) beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam perbanyak tanaman dengan metode kultur *in vitro* diantaranya yaitu:

1. Genotip tanaman

Genotip tanaman berhubungan dengan faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan eksplan seperti, kebutuhan nutrisi, ZPT dan lingkungan kultur. Hal ini disebabkan respon tanaman tergantung dari spesies dan varietas tanaman.

2. Media kultur

Perbedaan komposisi media sangat mempengaruhi respon eksplan saat dikulturkan. Perbedaan komposisi media biasanya sangat mempengaruhi arah pertumbuhan dan regenerasi eksplan. Contoh media yang digunakan secara umum adalah MS. Selain perbedaan komposisi media, konsentrasi hormon pertumbuhan optimal yang ditambahkan ke dalam media tergantung pula dari eksplan yang dikulturkan. Hormon pertumbuhan yang digunakan untuk perbanyak secara *in vitro* golongan auksin, sitokinik, giberelin dan *growth retardant*. Sedangkan media yang umum digunakan adalah medium padat, semi padat dan medium cair. Keadaan fisik media akan mempengaruhi pertumbuhan kultur dan kecepatan pertumbuhan.

3. Lingkungan tumbuh

Pada suhu ruang kultur dibawah optimum ataupun diatas suhu optimum, pertumbuhan eksplan akan terhambat. Suhu yang digunakan adalah konstan, yaitu 25°C. Sedangkan kelembapan relatif di ruang kultur umumnya adalah 70%. Intensitas cahaya yang digunakan pada ruang kultur umumnya jauh lebih rendah (1/10) dari intensitas cahaya yang dibutuhkan tanaman dalam keadaan normal. Intensitas cahaya dalam ruang kultur untuk

pertumbuhan tunas umumnya berkisar antar 600-1000 lux. Sedangkan periode terang dan gelap umumnya diatur pada kisaran 8-16 jam terang dan 16-8 jam gelap tergantung dari varietas dan eksplan yang digunakan.

4. Kondisi eksplan

Selain faktor genetik eksplan, kondisi eksplan yang mempengaruhi keberhasilan teknik mikropropagasi adalah jenis eksplan, ukuran, umur dan fase fisiologis jaringan yang digunakan sebagai eksplan. Eksplan dari jaringan tanaman yang masih muda lebih mudah tumbuh dan beregenerasi dibandingkan dengan jaringan yang telah terdiferensiasi lanjut (eksplan tua).

C. Zat Pengatur Tumbuh

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) merupakan senyawa organik bukan nutrisi atau hara yang dalam konsentrasi rendah ($< 1\text{mM}$) dapat mendorong, menghambat, dan secara kualitatif dapat mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Zat pengatur tumbuh yang sering digunakan dalam kultur *in vitro* dibagi menjadi beberapa golongan yaitu auksin, sitokinin, dan giberelin. Zat pengatur tumbuh berperan penting dalam mengontrol proses biologi pada bagian dalam jaringan tanaman (Gaba, 2005; Endang, 2011). Fungsi dari ZPT antara lain mengatur kecepatan pertumbuhan dari masing-masing jaringan dan mengintegrasikan bagian-bagian jaringan guna menghasilkan tanaman. Dalam pembentukan tunas, akar atau bagian lain dalam tanaman terdapat interaksi antara zat pengatur tumbuh endogen yang diproduksi oleh jaringan tanaman dengan zat pengatur tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam medium. Pada kultur *in*

in vitro penggunaan zat pengatur tumbuh tergantung pada tujuan dan arah pertumbuhan tanaman yang diinginkan.

Sitokinin sebagai zat pengatur tumbuh tanaman berfungsi sebagai memacu pertumbuhan dan perkembangan tanaman dengan merangsang proses pembelahan sel dan pembesaran sel, memacu pertumbuhan tunas baru dan menaikkan tingkat mobilitas unsur-unsur dalam tanaman. Penambahan ZPT sitokinin dalam konsentrasi yang sesuai akan merangsang pertumbuhan dan perkembangan tunas dan daun (Yusnita, 2006). Pembentukan daun pada eksplan tidak hanya dipengaruhi oleh hormon sitokinin tetapi dipengaruhi oleh kandungan hormon auksin endogen yang ada pada jaringan tanaman (Feryati dkk., 2018). Zat pengatur tumbuh yang termasuk golongan sitokinin yaitu ribosil, zeatin, kinetin dan bensil aminopurin (BAP).

Menurut George dan Sherington (1984) dalam Andaryani (2010) BAP merupakan salah satu sitokinin sintetik yang aktif dan daya merangsangnya lebih lama karena tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman. Menurut Noggle dan Fritz (1983) dalam Eka dkk., (2016) BAP memiliki struktur yang mirip dengan kinetin dan juga aktif dalam pertumbuhan dan poliferasi kalus, sehingga BAP merupakan salah satu sitokinin yang paling aktif. BAP berperan dalam mengarahkan transpor zat hara, mendorong proses morfogenesis, pemecah dormansi, pembungaan dan menstimulir poliferasi kalus dan meristem ujung (Santoso dan Nursandi, 2004).

Kultur *in vitro* dengan menggunakan media MS dan penambahan BAP telah banyak dilakukan dan dilaporkan. Menurut Isda *et al.*, (2015) penambahan 3

mg/L BAP menghasilkan jumlah tunas tertinggi untuk biji manggis asal bengkalis yang dibelah dua sebesar 1,55 tunas. Pada penelitian Novaliza *et al.*, (2016) perlakuan 3mg/L BAP mampu menumbuhkan jumlah tunas sebanyak 20 tunas per biji manggis. Penambahan BAP 5 mg/l BAP menunjukkan waktu pembentukan tunas paling cepat dan jumlah tunas paling tinggi pada hari ke 13 HST dan 2 tunas per eksplan pada biji manggis (Yuni dkk., 2014).

Auksin merupakan senyawa yang berpengaruh dalam menginduksi pembentukan kalus, akar dan kultur suspensi yaitu dengan memacu pembelahan dan pemanjangan sel di dalam jaringan kambium (Pierik,1987; Endang, 2011). Zat pengatur tumbuh yang tergolong dalam auksin adalah *Indolebutyric Acid* (IBA), *Indole Aceti Acid* (IAA), Naftalaen Asam Asetat (NAA) dan 2,4 Diklorofenoksiasetat (2,4-D). Diklorofenoksiasetat (2,4-D) merupakan golongan auksin sintesis yang memiliki sifat stabil karena tidak mudah terurai oleh enzim-enzim yang dikeluarkan sel atau pemanasan pada proses sterilisasi (Hendaryono dan Wijayani, 1994; Kartikasari dkk., 2013). Penambahan 2,4-D dalam media kultur *in vitro* menyebabkan pada kalus akan terbentuk tunas dan akar. Kelemahan dari 2,4-D sebagai ZPT yaitu menyebabkan tanaman yang dibudidayakan dapat mengalami mutasi sehingga terjadi variasi genetik.

Kalimuthu *et al.*, (2007) melaporkan bahwa hormon auksin yang dikombinasikan dengan sitokinin dapat mempengaruhi frekuensi dan memiliki dampak yang signifikan terhadap pematangan embrio somatik. Kombinasi zat pengatur tumbuh sitokinin dengan auksin dapat memacu morfogenesis dalam pembentukan tunas (Flick *et al.*, 1993; Endang 2011). Pada tanaman *Jatropha*

curcas L, penambahan BAP 0,5 ppm dengan penambahan 2,4-D 0,25 ppm memberikan waktu muncul tunas tercepat yaitu 6 HST dan konsentrasi BAP 2 ppm dan 2,4-D 0,25 ppm memberikan hasil yang optimal untuk menginduksi kalus (Andaryani, 2010).

D. Kultur Endosperm

Endosperm adalah jaringan triploid yang terdapat pada biji dan merupakan hasil dari penyatuan satu inti gamet jantan dan dua inti polar gamet betina. Endosperm merupakan massa sel parenchym yang homogen, tanpa jaringan pembuluh, selnya bervariasi, pembelahan, pemisahan kromosom dan poliploidnya. Endosperm bersifat triploid ($3n$) karena merupakan penyatuan 2 inti kandungan lembaga sekunder dan inti generatif 2 yang masing-masing bersifat haploid. Pada umumnya endosperm terdapat pada semua jenis tumbuhan berbunga dan merupakan bagian dari biji (Chaturvedi, 2008 dalam Agus, 2010).



Gambar 2. Contoh endosperm kepel

Lebih dari 80% bagian biji adalah endosperm yang merupakan sumber pati dan protein. Fungsi dari endosperm adalah memberikan sumber energi selama perkecambahan dan pertumbuhan embrio serta memelihara embrio selama pertumbuhan pada fase heterofit (Agus, 2010). Kultur endosperm secara *in vitro*

akan menghasilkan tanaman triploid, hal ini disebabkan karena endosperm merupakan jaringan triploid. Pada sebagian tanaman yang memiliki biji non endosperm, pengambilan eksplan endosperm ketika biji belum tua (Agus, 2010).

Kelebihan dari kultur *in vitro* eksplan endosperm akan menghasilkan bibit tanaman yang lebih unggul dibandingkan dengan bibit hasil persilangan, hal ini disebabkan karena tidak tereduksinya inti polar waktu fusi pada pusat sel megagatofit. Faktor keberhasilan kultur eksplan endosperm dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya yaitu umur endosperm, penyertaan zigot embrio, pencoklatan, dan umur kultur (Agus, 2010).

Umur endosperm saat dikulturkan memiliki fase kritis terhadap respon pertumbuhannya secara *in vitro* (Tao *et al.*, 2009; Agus, 2010). Eksplan endosperem yang memiliki umur terlalu muda atau melewati fase meristematis, umumnya tidak respon bila dikulturkan. Menurut Sukamto (1996) dalam Agus, (2010) eksplan endosperm muda pada fase sel-selnya masih meristematis, umumnya akan memiliki respon positif seperti pada endosperm *blackberry* 28 HSP, endosperm jagung umur 8-12 HSP dan endosperm ketimun 21 HSP. Pada endosperm tua dapat juga respon positif apabila dikulturkan seperti pada tumbuhan *Coffea arabica*, *Annona squamosa*, *apel* dan *parsely* (Lakshmi, 1987; Agus, 2010).

E. Sterilisasi

Sterilisasi adalah teknik membersihkan, membebaskan suatu benda dan menjaga kondisi ruang dari segala kehidupan mikroorganisme (protozoa, fungi, bakteri dan virus). Sterilisasi mempunyai peranan yang penting untuk

memperoleh keberhasilan teknik kultur *in vitro*. Untuk memperoleh kondisi yang aseptis maka perlu dibuat suatu laboratorium kultur *in vitro* yang khusus, terpisah antara bagian persiapan, pembuatan media, ruang penanaman dan aklimatisasi.

Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu secara fisik, mekanik, basah dan kimia. Sterilisasi secara fisik melalui suhu, radiasi dan penyaringan, pembakaran dan tekanan. Sterilisasi basah biasanya dilakukan dengan menggunakan *autoclave* uap dengan temperatur yang digunakan adalah 121°C dan tekanan 17,5 psi (*pounds per square inch*) selama 1 jam. Sterilisasi secara mekanik dapat digunakan dengan menggunakan filter yang berukuran 0,2-0,22 µM. Sterilisasi secara mekanik biasanya digunakan untuk bahan-bahan yang bersifat *heat labile* dalam bentuk larutan. Secara kimia sterilisasi dapat melalui perubahan komposisi molekul misalnya alkohol 70%, NaOCl, klor, iodium, etilen oksida dan H₂O₂.

Penggunaan bahan sterilan sangat dibutuhkan dalam melakukan perbanyakan tanaman secara kultur *in vitro*. Dalam kultur *in vitro* perbanyakan tanaman tanpa menggunakan bahan sterilan akan menghasilkan tingkat kontaminasi eksplan yang tinggi. Menurut Gunawan (2007), perbanyakan tanaman tanpa menggunakan bahan sterilan (kontrol) pada eksplan anggrek kuping gajah (*Bulbophyllum beecarii*) menyebabkan kontaminasi 80% terjadi pada hari ke 11 setelah inokulasi. Bahan-bahan sterilan pada umumnya bersifat racun, selain dapat membunuh patogen, bahan sterilan juga dapat mematikan jaringan tanaman. Konsentrasi bahan sterilan yang kecil menyebabkan eksplan rentan terhadap patogen, namun semakin tinggi konsentrasi bahan sterilan dapat

menghambat perkembangan jaringan pada tanaman *Aglaonema* sp (Rismayani dan Hamzah, 2007).

Bahan sterilan yang sering digunakan diantaranya adalah deterjen, bakterisida, fungisida dan alkohol. Deterjen memiliki bahan aktif surfaktan yang berfungsi membersihkan kotoran, memulsikan minyak sehingga mikroorganisme terperangkap dan hilang dalam pembilasan. Bakterisida (Agrept) mengandung bahan aktif streptomisin sulfat 25% yang bekerja secara sistemik bisa masuk ke dalam jaringan tanaman dan menjadikan jaringan tanaman bersifat racun bagi bakteri. Fungisida (Dithane M-45) mengandung bahan aktif menzoceb yang merupakan fungisida kontak berspektrum luas yang dapat menghambat enzim-enzim patogen (Nene dan Thapliyal.,1979 dalam Sari dkk., 2014). Fungisida (Dithane M-45) membentuk lapisan tipis pada eksplan dan secara perlahan mengeluarkan senyawa tertentu yang mengganggu aktifitas pernafasan jamur, dan mencegah pembentukan spora pada jamur sehingga tidak dapat menyebar.

Menurut Devy dan Sastra (2006), penggunaan bahan sterilan fungisida (Benlate) dan bakterisida (Agrept) masing-masing berkonsentrasi 2 g/L selama 24 jam dapat menekan tingkat kontaminasi pada kultur *in vitro* tanaman jahe. Selanjutnya menurut Budiono (2003) pada multiplikasi *in vitro* tunas bawang merah kultivar bawang Sumenep menunjukkan bahwa pada sterilisasi eksplan menggunakan bahan kimia sterilan berupa deterjen fungisida (Dithane M-45), bakterisida (Agrept) masing masing 4 g/L selama 24 jam dan Clorox 10% plus 5 tetes Tween-24 selama 24 jam dapat menekan tingkat kontaminasi sehingga eksplan sehat dapat mencapai 90%. Penggunaan alkohol 70% selama 3 menit

efektif dalam mensterilkan tanaman *Anredera cordifolia* dengan tingkat keberhasilan 92.76% (Gunawan, 1992).

F. Hidrogen Peroksida (H_2O_2)

Hidrogen peroksida (H_2O_2) adalah cairan asam lemah yang tidak berwarna, tidak berbau, bersifat kaustik, mengandung sulfat, terbentuk dari reaksi asam sulfat dan barium peroksida serta memiliki pH 5. Menurut Hasanudin (1991) hidrogen peroksida (H_2O_2) merupakan agen pengoksidasi atau *oxidizing agent* dengan daya anti bakteri spektrum luas. H_2O_2 atau hidrogen peroksida di alam terutama terbentuk oleh rangsangan cahaya matahari dan ditemukan pada air hujan serta salju. H_2O_2 murni pertama kali ditemukan oleh Richard Wolffenstein pada tahun 1894. H_2O_2 digunakan sebagai bahan pemutih tekstil, digunakan pada pemrosesan makanan, digunakan pada bidang pertanian, desinfektan serta deterjen. H_2O_2 tersebut memiliki kemampuan membunuh bakteri.

Sifat fisik H_2O_2 yaitu memiliki berat molar 34,0147 g/mol, titik didih $150^\circ C$ (423,35 K), titik cair $-11^\circ C$ (262,15 K), densitas 4 g/cm³ (cair), keasaman 9pKa) 11,65 viskositas 1,245cP pada suhu $20^\circ C$, serta tidak memiliki warna dan bau. Kadar H_2O_2 sebagai reagen yaitu 30% yang mana digunakan dalam percobaan di laboratorium dan biasanya mengandung stabilisator. Dalam penelitian yang telah dilakukan Safinah., dkk (2014) hidrogen peroksida (H_2O_2) digunakan untuk mengkondisikan permukaan akar serta membunuh jamur atau bakteri pada proses sterilisasi akar meranti.

Konsentrasi H_2O_2 yang digunakan untuk sterilisasi permukaan eksplan biasanya berkisar 3-20% namun tergantung pada jenis eksplan yang digunakan

(Martiansyah dkk., 2013). 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 mikororganisme. Menurut Srivastava *et al.*, (2010) kelebihan H₂O₂ dibandingkan dengan bahan kimia lainnya yaitu sifatnya yang ramah lingkungan karena mudah terurai menjadi air dan oksigen.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Farooq *et al.*, (2002) penggunaan 12% H₂O₂ dan 15 menit waktu perendaman mampu mencegah kontaminasi pada permukaan eksplan biji srikaya sebanyak 50%. Pada penelitian Mariansyah dkk., (2013) eksplan yang tidak dicuci dengan air mengalir, tetapi langsung dilakukan sterilisasi menggunakan etanol 70% selama satu menit dan H₂O₂ 17,6% selama 20 menit memberikan perlakuan terbaik dengan persentase eksplan hidup sebesar 76,67%.

G. Hipotesis

Penggunaan H₂O₂ pada sterilisasi endosperm kepel diduga pada konsentrasi 10% selama 10 menit mampu meminimalisir terjadinya kontaminasi.