

# **APLIKASI BERBAGAI ZAT ANTIOKSIDAN SEBAGAI PENGHAMBAT *BROWNING* MEDIA TANAM EKSPLAN JATI PUTIH (*Gmelina arborea* Roxb) SECARA *IN-VITRO***

**Gusmiaty<sup>1</sup>, Muh. Restu<sup>2</sup> dan Mutiah Ummusyahidah AR<sup>3</sup>**

<sup>1,2,3</sup>) Lab. Bioteknologi dan Pemuliaan Pohon, Fakultas Kehutanan Universitas Hasanuddin

\*E-mail : [gusmiaty@unhas.ac.id](mailto:gusmiaty@unhas.ac.id) ; [umyhody@gmail.com](mailto:umyhody@gmail.com)

## **ABSTRACT**

Browning is the most problem in plant tissue culture, both in growing media and explants. Browning is formed by oxidation process of phenolic compounds that can caused tissue death. The objective of this study were to analyze the effect of antioxidants addition against browning and to determine the best antioxidant to inhibited browning of *Gmelina arborea* explant growing media. The research was conducted by two steps, namely preparation of Murashige and Skoog (MS) media which are added 2,4-D growth regulators and addition of antioxidant PVP, ascorbic acid and activated charcoal. The results indicated that the addition of antioxidants in the media were able to inhibit browning process of the media as well as in the explant. Moreover, the ascorbic acid performed better ability to inhibit browning process compared to the other antioxidants.

Keywords: tissue culture, *Gmelina arborea* Roxb, browning, PVP, ascorbic acid and activated charcoal

## PENDAHULUAN

Jati putih atau yang dikenal dengan nama ilmiah *Gmelina arborea* merupakan salah satu jenis kayu yang pertumbuhannya cepat (*fast growing species*). Jenis kayu ini memiliki nilai ekonomi tinggi karena kayu jati putih biasanya digunakan sebagai bahan bangunan, bahan kertas, dan sebagai alternatif pengganti kayu sengon. Perbanyakan jati putih dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara generatif dan vegetatif. Perbanyakan secara generatif dengan biji yang jatuh disekitar pohon induk yang pernah berbuah dan akan tumbuh menjadi anakan Jati putih. Perbanyakan secara vegetatif dapat dilakukan dengan stek pucuk dan kultur jaringan (*in – vitro*).

Teknik *in – vitro* atau kultur jaringan merupakan salah satu teknik perbanyakan tanaman secara vegetatif dengan cara mengisolasi bagian tanaman seperti daun, mata tunas, serta menumbuhkan bagian-bagian tersebut dalam media buatan secara aseptik yang kaya nutrisi dan zat pengatur tumbuh dalam wadah tertutup yang tembus cahaya sehingga bagian tanaman dapat memperbanyak diri dan bergenerasi menjadi tanaman lengkap. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah perbanyakan tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril (Prasetyo, 2010). Keberhasilan dalam teknik kultur jaringan sangat ditentukan oleh proses inisiasi, dimana inisiasi adalah upaya penumbuhan meristem atau bagian tanaman (mata tunas, ujung akar, ujung daun muda, keping biji, dan sebagainya) agar tumbuh dalam botol bebas hama dan penyakit (dalam kondisi aseptik).

Pelaksanaan kultur jaringan pada kenyataannya mempunyai banyak permasalahan yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan. Salah satu masalah yang sering dihadapi adalah pencoklatan (*browning*). Pencoklatan merupakan hasil oksidasi senyawa fenolik yang menyebabkan kematian jaringan. Rokhiman (1998) menyatakan bahwa pencoklatan media dapat menghambat pertumbuhan kultur. Beberapa cara untuk mengatasi pencoklatan adalah dengan menambahkan zat antioksidan dalam media atau merendam eksplan terlebih dahulu kedalam larutan yang mengandung senyawa antioksidan. Antioksidan yang biasa

digunakan untuk menghambat pencoklatan adalah *Cystein*, *Polyvinylpyrolidone* (PVP), asam askorbat, arang aktif dan asam sitrat.

Berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang pengaruh penambahan zat antioksidan terhadap *browning* media tanam eksplan jati putih (*Gmelina arborea* Roxb) secara *in-vitro* dan untuk mendapatkan zat antioksidan terbaik sebagai penghambat *browning* media tanam eksplan jati putih (*Gmelina arborea* Roxb). Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai rujukan dalam mengurangi *browning* media tanam eksplan khususnya pada kultur jaringan jati putih.

## **BAHAN & METODE**

### **Waktu dan tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Februari 2012 di Laboratorium Silvikultur Fakultas Kehutanan Univesitas Hasanuddin.

### **Bahan-Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan adalah eksplan jati putih, media *Murashige and Skoog* (MS) yang diperkaya dengan *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D), sukrosa, agar, alkohol 70% , alkohol 96%, NaOCl (*Natrium hipoklorit*) 5,25 %, HCl, NaOH, aquadest steril, kertas saring, spritus, tissue, aluminium foil, plastik gula, karet, handsprayer, PVP, asam askorbat, arang aktif.

### **Pelaksanaan Penelitian**

#### **1) Pembuatan media perlakuan**

Guna memudahkan pekerjaan dan mengurangi tingkat kesalahan dalam menimbang bahan yang berulang-ulang tiap pembuatan media, maka terlebih dahulu dibuatkan larutan stok media serta stok zat pengatur tumbuh. Dalam penelitian ini, jenis media yang digunakan yaitu media MS (*Murashige and Skoog*).

Larutan stok diambil sesuai konsentrasi yang telah ditentukan kemudian dimasukkan kedalam labu takar, kemudian ditambahkan 2,4-D 5 ml/l. Setelah itu

ditambahkan aquades sehingga volume yang diinginkan kemudian dilakukan pengukuran pH yaitu 5,7 – 5,8. Apabila pH media terlalu rendah (kurang dari 5,7 - 5,8) maka dilakukan penambahan beberapa tetes 1 NaOH dan jika pH yang diperoleh lebih besar dari 5,8 maka dilakukan penambahan beberapa tetes HCl sehingga mencapai pH yang diinginkan. Sebelum media dipanaskan, maka dilakukan penambahan zat antioksidan sebanyak 200 mg/l sebagai bahan perlakuan, kemudian ditambahkan sukrosa dan agar – agar sebagai pematat.

Larutan media kemudian dipanaskan hingga mendidih kemudian dituang pada botol – botol kultur  $\pm$  20 ml dan menutupnya dengan aluminium foil atau plastik yang telah disiapkan. Botol – botol yang telah berisi media segera dimasukkan dalam *autoclave* untuk sterilisasi bahan selama satu jam pada tekanan 15,0 psi (Pounds per squar inch). Media yang telah selesai disterilkan disimpan dalam ruang inkubasi.

Setiap perlakuan terdiri atas 12 botol sehingga total pengamatan 48 botol.

Adapun perlakuan media terdiri atas:

- G0 : Media MS tanpa antioksidan (kontrol)
- G1 : Media MS + asam askorbat
- G2 : Media MS + PVP
- G3 : Media MS + arang aktif

## **2) Sterilisasi dan penanaman eksplan (Inokulasi)**

Bahan tanaman diambil dari nodus tanaman Jati putih, eksplan dari luar dicuci dengan air mengalir. Seteah dicuci eksplan kemudian dipotong-potong kecil setelah itu direndam dalam larutan detergen 0,02 g/20ml selama 5 menit. Kemudian eksplan dibilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya eksplan direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida yang telah ditetesi tween 80 yang konsentrasinya masing - masing 0,04 g/20 ml selama 60 menit dan setelahnya eksplan dibilas dengan aquadest steril sebanyak 3 kali. Steriisasi tadi dilakukan dilakukan diluar LAF, sterilisasi selanjutnya dilakukan dalam LAF namun sebelum LAF digunakan harus disterilkan dengan cara disemprotkan dengan alkohol 96 % dan dilap dengan tissue sampai bersih. Semua alat yang digunakan pada saat sterilisasi maupun penanaman juga disemprot dengan alkohol

kemudian dimasukkan ke dalam LAF. Alat steril yang dibungkus kertas tetap dalam keadaan terbungkus dan dibuka setelah di dalam LAF. Selanjutnya diberi penyinaran sinar UV selama 30 menit sebelum sterilisasi selanjutnya dan penanaman.

Eksplan yang telah disterilkan dengan fungisida dan bakterisida kemudian di sterilkan lagi dengan direndam dalam NaOCl 5,25% selama 10 menit, NaOCl 5,25% selama 5 menit, alkohol 70% selama 5 menit, dan 1ml/20ml betadine selama 5 menit. Setelah itu eksplan dibilas dengan aquadest steril sebanyak 2 kali. Eksplan yang telah disterilkan diambil dengan pinset dan ditiriskan di atas cawan petri yang beralaskan kertas saring, eksplan yang telah ditiriskan siap untuk diinokulasi. Setiap botol perlakuan hanya diisi satu potongan eksplan, untuk hari 1-14 setelah penanaman botol-botol kultur yang berisi eksplan disimpan dalam ruang gelap.

## **2. Pengamatan**

Pengamatan dilakukan setiap hari selama 21 hari

Parameter pengamatan yaitu :

### **1. Persentase Pencoklatan Media**

Persentase pencoklatan media diperoleh dari banyaknya media yang mengalami pencoklatan dibanding dengan banyaknya media sampel.

$$\text{Persentase (\%)} = \frac{\text{Jumlah media yang browning}}{\text{Jumlah media sampel}} \times 100\%$$

### **2. Kecepatan terjadinya pencoklatan**

Pengamatan kecepatan terjadinya pencoklatan dilakukan setiap hari setelah dilakukan inokulasi eksplan.

## **3. Analisis Data**

Penelitian ini menggunakan analisis deskriptif kuantitatif yaitu menyajikan data-data faktual kemudian dianalisis dan ditampilkan dalam bentuk grafik persentase pencoklatan dan kecepatan terjadinya pencoklatan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Pencoklatan pada Media Tanam (Persentase Pencoklatan)

Pencoklatan pada media tanam eksplan jati putih (*Gmelina arborea* Roxb) pada Gambar 1 ditandai dengan perubahan warna pada media menjadi coklat atau coklat kehitaman yang disebabkan oleh keluarnya senyawa fenol dari bekas potongan eksplan. Terjadinya pencoklatan pada media tanam menyebabkan eksplan mengalami penghambatan pertumbuhan bahkan mengalami kematian.

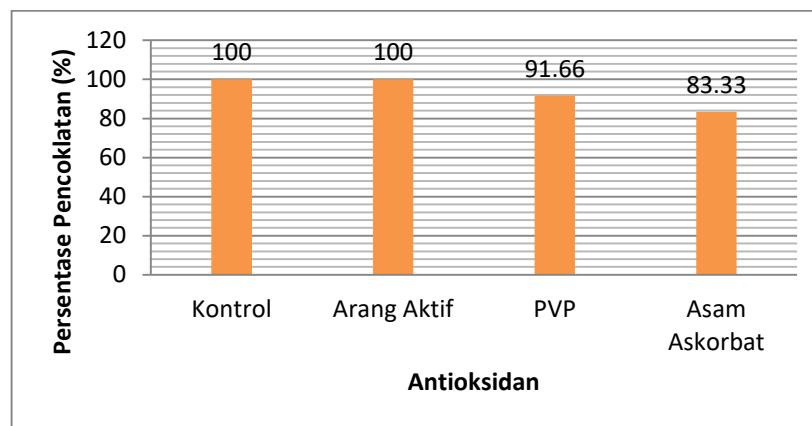


Gambar 1. Pencoklatan pada Media Tanam Eksplan Jati Putih (*Gmelina arborea* Roxb) secara *in-vitro*

Pencoklatan sangat umum terjadi pada spesies tanaman berkayu, terutama bila eksplan diambil dari pohon dewasa. *Browning* umumnya disebabkan oleh senyawa fenolik yang biasanya muncul dan terakumulasi ketika eksplan dilukai, yang biasanya disebabkan oleh aktivasi dari enzim Polyphenol oxidase (PPO). Pelukaan organ dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan metabolisme dari ROS (*Reactive Oxygen Species*), peroksidasi pada membran lipid, dan kehilangan integritas membran sel yang dapat memicu over akumulasi dari senyawa fenolik dan menyebabkan terjadinya *browning* (Ru, et al., 2013). PPO dan peroxidase (POD) diketahui banyak ditemukan pada family Euphorbiaceae, Moraceae, dan Anacardiaceae yang antara lain berhubungan dengan kandungan getah (lateks) yang tinggi (John, et al., 2003). Umumnya, pencoklatan merupakan hasil dari interaksi antara aktivitas enzim PPO dan kandungan polifenol. Seperti diketahui, perubahan

permeabilitas membran menyebabkan pelepasan enzim dan substrat pada sitosol yang memicu pigmentasi atau pencoklatan (Mellidou et al., 2014).

Hasil pengamatan persentase pencoklatan pada perlakuan penambahan zat antioksidan pada media tanam menunjukkan adanya variasi persentase dari perlakuan yang diberikan, seperti disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Persentase Pencoklatan Media Tanam Eksplan Jati Putih (*Gmelina arborea* Roxb) secara *in-vitro*

Berdasarkan hasil pengamatan persentase pencoklatan media pada Gambar 2 di atas menunjukkan bahwa penambahan zat antioksidan PVP dan asam askorbat dalam media tanam mampu memperlambat terjadinya pencoklatan media, walaupun persentase pencoklatan masih tergolong tinggi. Persentase pencoklatan tertinggi pada perlakuan penambahan zat antioksidan arang aktif dan tanpa penambahan zat antioksidan (kontrol) yaitu sebesar 100%, penambahan zat antioksidan PVP sebesar 91,66% dan terendah pada penambahan zat antioksidan asam askorbat sebesar 83,33%.

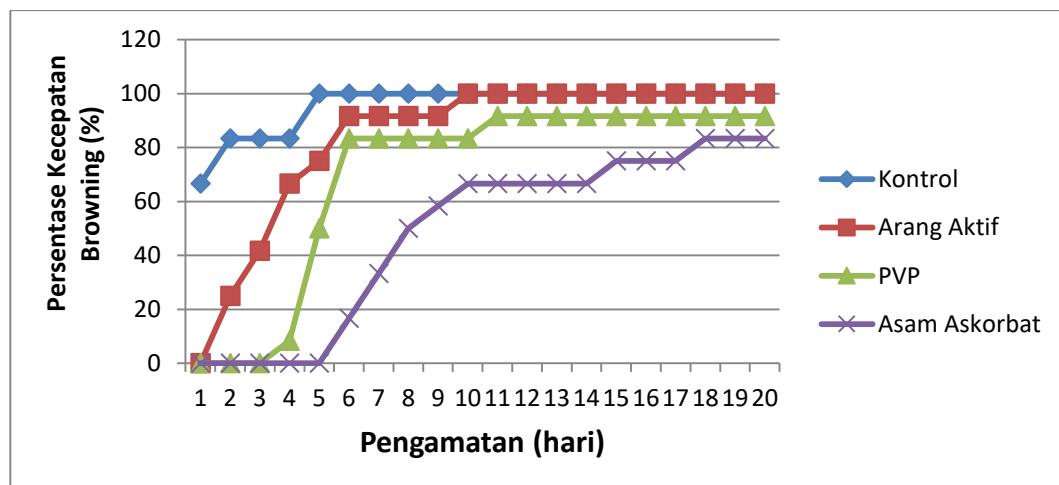
Penambahan asam askorbat pada penelitian ini menunjukkan hasil terbaik sebagai penghambat proses pencoklatan dengan persentase pencoklatan yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Nurbayanti (1998) dimana dengan perlakuan asam askorbat mampu menghambat terjadinya pencoklatan (0 %) pada media eksplan mangga dengan lama pengamatan 42 hari. Pada tanaman pir (*Pyrus communis* L.), kombinasi antioksidan (100 mg/L asam askorbat dan 150 mg/L asam

sitrat) sebagai pra perlakuan selama 1 jam + Polyvinyl pyrrolidone (PVP) 160 mg/L + arang aktif 200 mg/L yang ditambahkan pada media signifikan mengurangi nekrosis dan browning (Esmail et al., 2014). Selanjutnya hasil penelitian Admojo dan Indrianto (2016) pada perendaman eksplan midrib daun klon karet dalam 100 mg/L asam askorbat steril selama 30 menit, yang diinkubasi dalam ruang gelap efektif menurunkan intensitas browning hingga 7,5% dengan jumlah eksplan yang mengalami browning dapat ditekan hingga 30%. Hal ini disebabkan karena setiap tanaman memiliki kandungan fenol yang berbeda – beda. Kemungkinan kandungan fenol yang dimiliki jati putih lebih tinggi dibandingkan dengan jenis tanaman tersebut sehingga persentase pencoklatan pada media eksplan jati putih masih tinggi.

Perbanyak tanaman berkayu melalui teknik kultur jaringan (*in-vitro*) tidaklah semudah dan secepat tanaman hortikultura. Kendala yang sering muncul dalam kultur tanaman berkayu yaitu adanya senyawa fenol yang dikeluarkan oleh eksplan tanaman yang dapat menyebabkan racun pada media tanam sehingga mengganggu pertumbuhan dan perkembangan kultur.

## B. Kecepatan terjadinya pencoklatan

Hasil pengamatan kecepatan terjadinya pencoklatan pada media tanam eksplan Jati putih mulai dari sehari setelah inokulasi sampai dengan 21 hari setelah inokulasi, yang disajikan pada Gambar 2.





Gambar 2. Kecepatan browning (hari) pada media tanam eksplan jati putih pada berbagai penambahan zat antioksidan

Hasil pengamatan menunjukkan perubahan warna media akibat reaksi pencoklatan tercepat dialami pada media tanam tanpa zat antioksidan yaitu pada hari pertama setelah inokulasi dan yang paling lama mengalami perubahan warna adalah media tanam yang ditambahkan asam askorbat yaitu pada hari ke 6. Perlakuan penambahan zat antioksidan menunjukkan bahwa pada penambahan arang aktif, eksplan mengalami pencoklatan pada hari ke dua setelah inokulasi dengan persentase 25 % dan mencapai 100 % pada hari 10 setelah inokulasi.

Penambahan PVP pada media tanam eksplan mengalami pencoklatan pada hari ke 4 dengan persentase pencoklatan 8,33 % , pada perlakuan ini persentase jumlah eksplan yang mengalami pencoklatan tidak mencapai 100% perubahannya hanya mencapai 91,66% pada hari ke 11 dan konstan hingga hari terakhir penelitian. Sedangkan pada perlakuan penambahan asam askorbat, eksplan mengalami pencoklatan pada hari ke 6 dengan persentase jumlah eksplan yang pencoklatan 16,66%. Sama halnya dengan penambahan PVP pada perlakuan ini juga tidak mencapai 100%, perubahannya lebih rendah dari PVP yaitu 83,33%, terjadi pada hari ke 18 setelah inokulasi.

Arang aktif kurang efektif dalam memperlambat kecepatan terjadinya pencoklatan, dimana pada hari kedua sudah terjadi pencoklatan dan perlahan – lahan meningkat dan akhirnya secara keseluruhan mengalami pencoklatan. Hal ini diduga karena kurangnya konsentrasi arang aktif yang digunakan. Sampai saat ini telah diketahui efek-efek yang menguntungkan dari arang aktif tergantung dari tipe kultur yang dilakukan, antara lain adalah menyerap senyawa yang disekresikan oleh jaringan atau senyawa yang ada dalam jaringan yang dapat menghambat pertumbuhan.

Media yang ditambahkan dengan PVP juga dapat dikategorikan kurang efektif dalam memperlambat kecepatan terjadinya pencoklatan, oleh karena pencoklatan terjadi pada hari keempat dan proses peningkatan persentase pencoklatan cukup cepat dari hari keempat hingga hari kelima. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa perlakuan tanpa penambahan zat antioksidan, lebih

cepat mengalami pencoklatan yaitu pada hari pertama setelah inokulasi. Hal ini disebabkan karena pada saat pemotongan eksplan aktivitas enzim polifenol oksidase aktif sehingga menghasilkan fenol yang menyebabkan pencoklatan pada eksplan. Selanjutnya eksplan langsung diinokulasi tanpa adanya perlakuan, sehingga senyawa fenol yang keluar lebih banyak dan mempercepat terjadinya proses pencoklatan. Santoso dan Nursandi (2002) menjelaskan secara mekanik bahwa pencoklatan dapat terjadi karena proses perlakuan. Pencoklatan karena perlakuan banyak terjadi pada kultur tanaman yang banyak mengandung senyawa hidroksiphenol dan tannin, proses pemanasan, terutama terjadi pada eksplan tanaman yang banyak kandungan gulanya. Kejadian perlakuan akibat proses tersebut sangat mungkin terjadi karena kegiatan kultur jelas menggunakan pendekatan perlakuan (pengirisan eksplan) dan pembakaran api bunsen.

Hasil akhir pengamatan menunjukkan bahwa perlakuan arang aktif dan kontrol mengalami pencoklatan media secara keseluruhan. Berbeda halnya pada penelitian Tarampak, dkk (2019), dimana perlakuan pada media dengan penambahan asam askrobat 1 mg/L dan arang aktif 4,00 g/L yang ditempatkan pada ruang gelap merupakan yang terbaik dengan tingkat keberhasilan 100%, dimana eksplan tidak mengalami *browning* dikarenakan arang aktif memiliki permukaan relatif bebas dari deposit, permukaan luas dari pori-pori telah terbuka sehingga memiliki daya serap tinggi terhadap phenol, rendered oksidase phenol, menginaktifkan peroksidase serta menghilangkan pewarnaan. Penambahan arang aktif pada penelitian tersebut sangat efektif mengatasi terjadinya *browning* sementara pada penelitian ini tidak memberikan pengaruh yang signifikan bahkan secara keseluruhan media mengalami pencoklatan. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena konsentrasi arang aktif yang digunakan jauh lebih rendah yaitu 200 mg/L.

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Penambahan zat antioksidan dalam media tanam mampu memperlambat terjadinya *browning* pada media tanam.

2. Asam askorbat mempunyai kemampuan lebih baik untuk memperlambat proses pencoklatan dibanding zat antioksidan lainnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Admojo, L. dan Indrianto, A. 2016. Pencegahan Browningfase Inisiasi Kalus pada Kultur Midrib Daun Klon Karet (*Hevea brasiliensismuell.* Arg) PB 330. Jurnal Penelitian Karet. 34 (1) : 25-34
- Esmail, A. L. G., Haggag, L. F., Barakat, M. N., Farag, K. M., Zayed, N. S., and Fouad, A. A. 2014. Direct effect of medium types, explant type and antioxidant treatments on micropropagation of Pyrus" Lecont". Middle East Journal of Agriculture Research. 3(3), 618-622. [www.curreweb.com/mejar/mejar/2014/608-622.pdf](http://www.curreweb.com/mejar/mejar/2014/608-622.pdf)
- John, K.S., Bhat, S.G., and Rao, P.U.J.S . 2003. Biochemical characterization of sap (latex) of a few indian mango varieties. Phytochemistry. 62(1), 13–19. Doi : 10.1016/S0031-9422(02)00441-7
- Mellidou, I., Buts, K., Hatoum, D., Ho, Q. T., Johnston, J. W., Watkins, C. B., Schaf fer, R. J. , Gapper, N. E.,Giovannoni, J. J., Rudell, D. R.,Hertog, M. L. A. T. M., and Nicolai, B. M. 2014. Transcriptomic events associated with internal browning of apple during postharvest storage. BMC Plant Biology. 14, 328 (17p). doi:10.1186/s12870-014-0328-x
- Nurbayanti, E., 1998. Pengaruh Penambahan Zat Antioksidan dalam Media Tanam Terhadap Pertumbuhan Eksplan Mangga (*Mangifera indica* L.) Secara *In-Vitro*. [Skripsi]. Malang : Universitas Muhammadiyah Malang.
- Prasetyo, D., 2010. Kultur Jaringan (<http://www.danankprasetyohehaheho.com>, diakses 28 Februari 2011).
- Rokhimah., 1998. Pengaruh Lama Penggojokan Eksplan dalam Media Cair Terhadap Proses Pencoklatan Pada Kultur Pucuk Tebu (*Saccharum officinarum*) Varietas PS 61 dan M 442-51. [Skripsi]. Malang: Universitas Muhammadiyah Malang.
- Ru, Z., Lai, Y., Xu, C., and Li, L. 2013. Polyphenol oxidase (PPO) in early stage of browning of Phalaenopsis leaf explants. Journal of Agricultural Science. 5(9). 57-64. doi:10.5539/jas.v5n9p57
- Santoso, U. dan Nursandi, F. 2002. Kultur Jaringan Tanaman. Malang: UMM Press.
- Tarampak, T.C., Sulistiawati dan Nirmala, R. 2019. Metode Mengatasi Browning pada Eksplan Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) untuk Inisiasi Regenerasi secara

In Vitro. Jurnal Agroekoteknologi Tropika Lembab 1(2) : 106-117. ISSN:  
2622-3570 ; E-ISSN: 2621-394X.