



Optimasi Sterilisasi Permukaan Daun dan Eliminasi Endofit pada Burahol

Optimization of Leaf Surface Sterilization and Endophytic Elimination on Burahol

✉ Noor Aini Habibah, Sumadi, Sri Ambar

¹urusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima Juli 2013
Disetujui Agustus 2013
Dipublikasikan September 2013

Keywords:

*Optimization Of
Surface Sterilization;
Endophyte; Burahol*

Abstrak

Burahol termasuk tanaman yang buahnya dapat dimakan, dan mempunyai zat-zat aktif yang berpotensi sebagai obat dan deodoran alami. Kultur *in vitro* merupakan salah satu cara dalam produksi metabolit sekunder. Tingginya kontaminasi merupakan salah satu hal yang menjadi kendala dalam kultur *in vitro*. Salah satu sumber kontaminan adalah eksplan yang digunakan dalam kultur *in vitro*. Optimasi sterilisasi permukaan merupakan langkah awal yang sangat penting dalam pengembangan kultur *in vitro*. Penelitian ini bertujuan mendapatkan prosedur optimasi sterilisasi permukaan eksplan daun burahol dan juga melakukan deteksi dan eliminasi endofit pada daun burahol. Optimasi sterilisasi permukaan dilakukan dengan perlakuan variasi konsentrasi klorox dan waktu perendaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun burahol mengandung jamur endofit. Eliminasi jamur endofit dapat dilakukan dengan penyiraman tanaman dengan fungisida. Sterilisasi permukaan eksplan yang paling optimal adalah dengan fungisida selama 24 jam, dilanjutkan dengan perendaman bakterisida dan fungisida selama 30 menit, perendaman pada alcohol 70% selama 1 menit, dilanjutkan dengan klorox 15% 10 menit, dan klorox 10% 10 menit berturut-turut.

Abstract

Burahol has active substances with potential as a drug and natural deodorant. In vitro culture is one way to production of secondary metabolites. High contamination is one of the things that become obstacles in in vitro culture. One of the contaminant source is explant that used in in vitro culture. Optimization of surface sterilization is a very important first step in the development of in vitro culture. This study aims to get the optimization procedure surface sterilization of burahol leaf explant and also perform detection and elimination endophyte on burahol leaves. Optimization surface sterilization is done by treatment by variations clorox concentration and immersion time. The results showed that the burahol leaves contain fungal endophytes. Endophytic fungus elimination can be done by sprinkling the plants with fungicides. Explant surface sterilization is the most optimal with fungicide for 24 hours, followed by immersion bactericide and fungicide for 30 minutes, immersion in 70 % alcohol for 1 min, followed by 10 minutes clorox 15 %, and 10 % clorox 10 minutes.

© 2013 Universitas Negeri Semarang

✉ Alamat korespondensi:

FMIPA UNNES Gd D6 Lt 1 Jln. Raya Sekaran- Gunungpati- Semarang 50299
Telp./Fax. (024) 8508033; E-mail: nooraini.habibah@yahoo.com

ISSN 2085-191X

PENDAHULUAN

Burahol termasuk tanaman yang buahnya dapat dimakan, dan mempunyai zat-zat aktif yang berpotensi sebagai obat dan deodoran alami (Darusman *et al.* 2012, Purwantiningsih *et al.* 2010, Sunardi 2010, Tisnadjaja *et al.* 2006). Pengetahuan yang sangat terbatas pada waktu yang lalu berkaitan dengan potensi burahol sebagai obat menyebabkan burahol dianggap mempunyai nilai ekonomis yang rendah sehingga tidak banyak orang yang menanam. Saat ini banyak orang yang sudah tidak lagi mengenal burahol karena sudah termasuk tanaman asli Indoensia yang langka. Kesadaran akan pelestarian tanaman langka kemudian mendasari beberapa penelitian untuk menggali informasi mengenai potensi burahol sebagai obat (Sunarto 1999, Sunardi 2010, Tisnadjaja *et al.* 2006).

Salah satu upaya untuk melestarikan tanaman langka adalah melakukan penanaman tanaman tersebut pada berbagai tempat. Ketersediaan bibit merupakan suatu hal yang penting untuk mendukung pelestarian tanaman ini. Perbanyakkan secara *in vitro* merupakan salah satu alternatif untuk dapat menghasilkan bibit yang baik dalam jumlah yang banyak. Tingginya kontaminasi merupakan salah satu hal yang menjadi kendala dalam kultur *in vitro*. Sumber kontaminasi dapat berasal dari eksplan, media, alat dan lingkungan yang tidak steril. Sehingga perlu dilakukan sterilisasi eksplan, media, alat dan lingkungan kerja (Gunawan 1988). Tahap sterilisasi permukaan eksplan merupakan tahap awal perkembangan kultur *in vitro*. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai cara, baik secara fisik maupun kimia. Secara fisik melalui suhu, tekanan, radiasi dan penyaringan, misalnya sterilisasi, pembakaran atau sanitasi. Secara kimia melalui perubahan komposisi molekul misalnya dengan senyawa-senyawa fenolik, alkohol, klor, iodium dan etilen oksida. Keefektifan zat antimikrobia tergantung konsentrasi, jumlah dan jenis mikroorganisme, suhu, bahan organik terlarut dan pH (Pelczar dan Chan 1988).

Kontaminasi pada eksplan tanaman tidak hanya dari lingkungan, tetapi dari tanaman itu sendiri. Sebagian besar tanaman merupakan inang bagi satu atau lebih mikroorganisme endofit. Biasanya fungi merupakan mikroorganisme endofit yang paling umum diisolasi (Taechowisan *et al.* 2006). Saat ini jamur endofit mendapat perhatian yang lebih karena ditemukan kegunaan dari endofit. Endofit mempunyai banyak fungsi di dalam tanaman host, antara lain meningkatkan produksi biomasa dan penyerapan metal

(Luo *et al.* 2012), penyerapan nutrisi (Malinowski *et al.* 2000), meningkatkan produksi metabolit sekunder (Kusari *et al.* 2012), toleransi kekeringan (Barrow *et al.* 2004), melindungi tanaman inang dari serangan organisme pengganggu tanaman seperti hama maupun pathogen (Puspita *et al.* 2013).

Beragamnya senyawa ekstrinsik yang dikeluarkan oleh jamur endofit berimplikasi kepada ketahanan tanaman baik terhadap berbagai organisme pengganggu tanaman maupun juga terhadap kondisi lingkungan seperti kekeringan. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh endofit pada berbagai tanaman telah banyak dilaporkan (Kusari *et al.* 2012, Puspita *et al.* 2013, Barrow *et al.* 2004). Pada *Tinospora cordifolia* frekuensi kolonisasi bervariasi tergantung tipe jaringan dan iklim dibanding lokasi (Mishra *et al.* 2012).

Meskipun endofit juga bermanfaat dalam pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan, tetapi pengendalian kehadiran endofit dalam kultur *in vitro* merupakan hal yang sangat penting (Pirttila *et al.* 2012). Pertumbuhan endofit dalam kultur dapat menyebabkan kegagalan pertumbuhan kultur *in vitro* karena keberadaan endofit akan menyebabkan eksplan menjadi busuk. Eliminasi endofit dapat dilakukan dengan pemberian fungisida secara sistemik (Mng'omba *et al.* 2007).

METODE

Optimasi sterilisasi permukaan eksplan dilakukan dengan variasi konsentrasi klorox (mengandung 5,25% NaOCl) yaitu 10 dan 15 % dan waktu perendaman 5, 10 dan 15 dan kombinasi perlakuan dengan fungisida dan bakterisida. Eksplan dikatakan steril jika tidak mengalami kontaminasi selama 6 minggu sejak hari pertama ditanam dalam medium Murashige & Skoog (MS).

Deteksi jamur endofit pada daun dilakukan berdasarkan metode yang dideskripsikan oleh Maksum *et al.*, (2011) dengan modifikasi. Daun disterilisasi menggunakan metode sterilisasi yang paling optimal. Setelah dilakukan sterilisasi permukaan, selanjutnya daun dipotong menjadi fragmen kecil dengan luas 2 cm² dalam kondisi aseptis menggunakan scalpel steril. Potongan daun kemudian diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi media PDA, diinkubasi pada suhu 25 °C selama 15 hari. Daun yang digunakan adalah daun dari tanaman yang belum diberi fungisida, dan daun dari tanaman yang telah disiram fungisida secara berkala. Keberadaan jamur endofit ditentukan berdasarkan munculnya koloni jamur setelah inkubasi selama 15 hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi sterilisasi eksplan merupakan tahap awal pengembangan kultur *in vitro*. Jika sterilisasi permukaan eksplan tidak berhasil dengan baik maka kultur *in vitro* tidak dapat diperoleh. Eksplan harus dalam keadaan steril untuk dapat ditumbuhkan pada medium kultur karena adanya mikroorganisme di dalam kultur akan menyebabkan pertumbuhan eksplan terhambat. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai bahan sterilan. Salah satu bahan sterilan yang umum digunakan adalah NaOCl. Konsentrasi NaOCl yang digunakan bervariasi tergantung pada eksplan yang digunakan (Mousavi *et al.* 2012, Wardani *et al.* 2003, Silva *et al.* 2003). Klorox merupakan larutan yang mengandung NaOCl 5,25%. Hasil optimasi sterilisasi permukaan eksplan daun burahol dapat dilihat pada Tabel 1.

Dengan berbagai macam variasi sterilisasi ternyata belum bisa mendapatkan eksplan steril dalam persentase yang besar. Kontaminasi eksplan berupa jamur pada perlakuan optimasi

sterilisasi umumnya muncul pada minggu keempat bahkan ke enam setelah hari pertama penanaman. Dugaan adanya endofit muncul karena menurut Kusari *et al.* (2012), koloni jamur endofit tumbuh sangat lambat, diawali dengan bentuk kapas putih. Hal ini juga terjadi pada kultur burahol, dimana jamur yang muncul setelah minggu keempat juga berbentuk kapas putih yang dimulai dari bagian tengah eksplan yang dilukai. Oleh karena itu dilakukan deteksi adanya jamur endofit.

Deteksi adanya jamur endofit dilakukan dengan menanam daun dengan berbagai variasi perlakuan. Deteksi dilakukan dengan melihat munculnya koloni jamur pada daun yang ditanam pada medium PDA. Hasil deteksi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tumbuhnya 2 macam jamur pada daun yang berasal dari tanaman tanpa penyiraman fungsida dan tidak disterilisasi menandakan adanya jamur ekstrinsik dan intrinsik, hal ini dikonfirmasi dengan hanya tumbuhnya 1 macam jamur saja ketika daun dari tanaman yang sama disterilisasi permukaan. Ketika sterilisasi permukaan dilakukan maka jamur ekstrinsik akan hi-

Tabel 1. Optimasi sterilisasi permukaan eksplan daun burahol pada berbagai perlakuan klorox

Cara Sterilisasi	Hasil	
	% Kontaminasi	% steril
klorox 15% + twen 3 tetes selama 10 menit, klorox 10% + twen 3 tetes selama 10 menit, klorox 10% + twen 3 tetes selama 5 menit, fungsida+bakterisida selama 30 menit.	100	0
klorox 15% + twen 3 tetes selama 10 menit, klorox 15% + twen 3 tetes selama 5 menit, klorox 10% + twen 3 tetes selama 10 menit	100	0
alcohol 70% selama 1 menit klorox 10% + twen 3 tetes selama 10 menit, klorox 5% + twen 3 tetes selama 10 menit,	100	0
bakterisida + fungsida selama 24 jam. fungsida+bakterisida selama 30 menit. klorox 10% + twen 3 tetes selama 15 menit,	85	15
bakterisida + fungsida selama 24 jam. fungsida+bakterisida selama 30 menit larutan detol 30 menit alcohol 70% selama 1 menit klorox 10% + twen 3 tetes selama 20 menit,	93	7
bakterisida + fungsida selama 24 jam. fungsida+bakterisida selama 30 menit. alcohol 70% selama 1 menit klorox 10% + twen 3 tetes selama 10 menit, klorox 10% + twen 3 tetes selama 10 menit	89	11

Tabel 2. Hasil deteksi jamur endofit dari daun burahol dengan berbagai perlakuan

Asal daun	Perlakuan	Munculnya jamur
Tanaman tanpa penyiraman fungisida	Tanpa sterilisasi	Koloni jamur dengan warna hitam dan putih
	Disterilisasi :	Koloni jamur warna putih
Tanaman dengan penyiraman fungisida	Tanpa sterilisasi	Koloni jamur putih
	Disterilisasi	Tidak tumbuh jamur

Keterangan: prosedur sterilisasi yang dilakukan adalah : fungisida 24 jam; fungisida+bakterisida 30 menit; alkohol 70% 1 menit; klorox 10% 10 menit, klorox 10% 10 menit

lang karena sterilisasi permukaan menghilangkan kontaminan yang ada di permukaan eksplan. Sterilisasi permukaan tidak mampu menghilangkan jamur endofit oleh karena itu maka tetap muncul jamur meskipun daun dari tanaman tanpa penyiraman fungisida telah disterilisasi permukaannya. Pertumbuhan endofit pada daun kepel dapat lihat pada Gambar 1.

Tumbuhnya jamur pada daun yang telah disterilisasi yang diambil dari tanaman yang tidak disiram fungisida serta tidak munculnya jamur pada daun yang telah disterilisasi yang diambil dari tanaman yang disiram fungisida juga menunjukkan adanya endofit. Daun yang telah disterilisasi permukaan seharusnya sudah steril dan tidak tumbuh jamur tetapi ternyata pada tanaman yang tidak disiram fungisida jamur tetap muncul. Jamur ini tumbuh dengan lambat dan berbau wangi. Hal ini memperkuat dugaan bahwa terdapat endofit pada daun burahol. Mikroba endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tumbuhan. Mikroba endofit dapat diisolasi dari jaringan akar, batang dan daun, dan yang paling umum ditemukan adalah dari jenis fungi (Strobel 2003).

Adanya bau wangi yang muncul ketika jamur tersebut tumbuh kemungkinan karena kandungan metabolit sekunder yang diproduksi endofit. Hal ini memperkuat pernyataan Kusari *et al.* (2013), Puspita *et al.* (2013), Barrow *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa endofit dapat menghasilkan metabolit sekunder. Senyawa yang dikeluarkan mikroba endofit berupa senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa bioaktif dan dapat berfungsi untuk membunuh pathogen (Strobel 2003).

Tidak munculnya koloni jamur pada daun yang diambil dari tanaman yang disiram dengan fungisida secara teratur menunjukkan bahwa perlakuan penyiraman fungisida dapat menekan pertumbuhan bahkan mematikan jamur endofit. Hal ini memperkuat pernyataan Mng'omba *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa jamur endofit dapat dihilangkan dengan pemberian fungisida

secara sistemik dan teratur. Meskipun endofit juga bermanfaat dalam pertumbuhan dan perkembangan, antara lain meningkatkan toleransi kekeringan (Barrow *et al.* 2004), melindungi tanaman inang dari serangan organisme pengganggu tanaman seperti hama maupun pathogen (Puspita *et al.* 2013), tetapi pengendalian kehadiran endofit dalam kultur *in vitro* merupakan hal yang sangat penting (Thomas 2004, Pirtila *et al.* 2012). Pertumbuhan endofit dalam kultur dapat menyebabkan kegagalan pertumbuhan kultur *in vitro* karena pertumbuhan jamur lebih cepat dari pada pertumbuhan eksplan sehingga akan menghambat pertumbuhan eksplan. Pertumbuhan endofit yang lebih cepat pada akhirnya akan menyebabkan eksplan busuk dan mati.

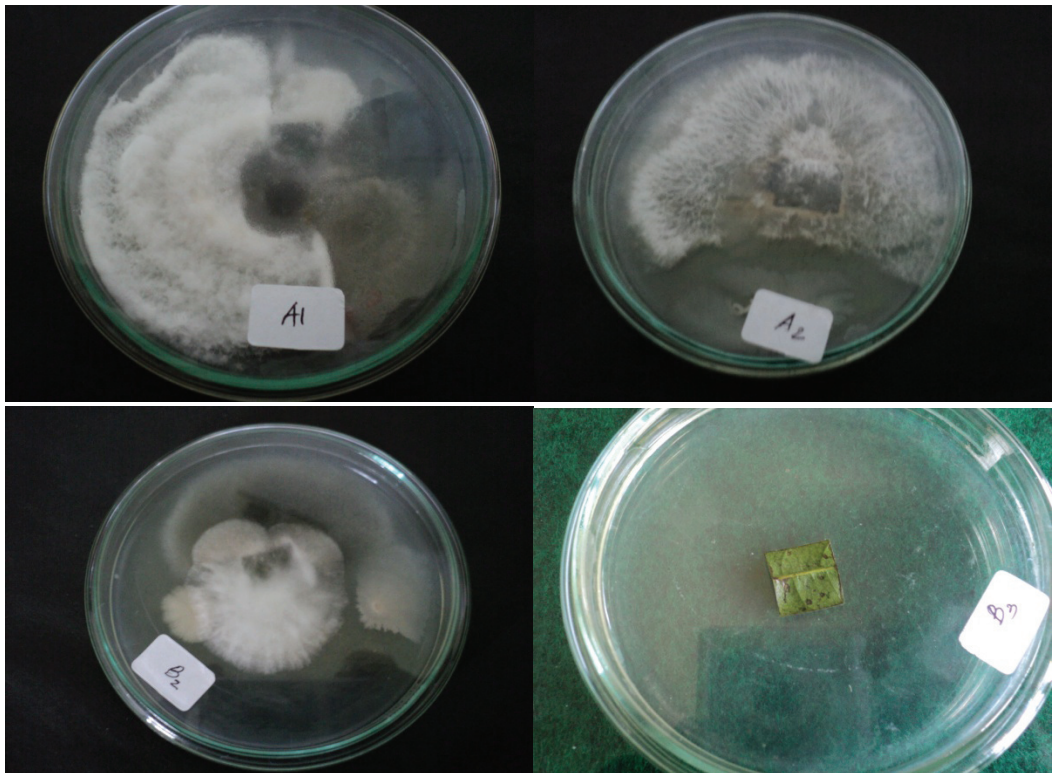
Tidak munculnya jamur pada perlakuan tanaman disiram fungisida dan disterilisasi juga menunjukkan bahwa prosedur sterilisasi dengan fungisida selama 24 jam, dilanjutkan dengan perendaman bakterisida dan fungisida selama 30 menit, perendaman pada alkohol 70% selama 1 menit, dilanjutkan dengan klorox 15% 10 menit, dan klorox 10% 10 menit berturut-turut merupakan metode sterilisasi permukaan eksplan daun burahol yang paling optimal.

SIMPULAN

Jamur endofit ditemukan pada daun burahol. Perlakuan berupa penyiraman dengan fungisida secara teratur menghilangkan jamur endofit. Sterilisasi permukaan eksplan yang paling optimal adalah dengan fungisida selama 24 jam, dilanjutkan dengan perendaman bakterisida dan fungisida selama 30 menit, perendaman pada alkohol 70% selama 1 menit, dilanjutkan dengan klorox 15% 10 menit, dan klorox 10% 10 menit berturut-turut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Dikti yang telah mendanai skim penelitian Hibah Bersaing tahun 2013



Gambar 1. Pertumbuhan koloni jamur pada berbagai perlakuan daun burahol
 A1 Daun dari tanaman yang tidak disiram fungisida dan tidak disterilisasi
 A2 Daun dari tanaman yang tidak disiram fungisida dan disterilisasi
 B2 Daun dari tanaman yang disiram fungisida dan tidak disterilisasi
 B3 Daun dari tanaman yang disiram fungisida dan disterilisasi

ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Barrow J R, Avilla P, dan Vera I. 2004. Fungal endophytes intrinsically associated with Micropropagated plants regenerated from native *Bouteloua eriopoda* Torr. And *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*—*Plant* 40:608–612
- Darusman HS, Rahminiwati, M, Sadiah S, Batubara I, Darusman LK, & Mitsunaga T. 2012. Indonesian Kepele Fruit (*Stelechocarpus burahol*) as oral Deodorant. *Research Journal of Medicinal Plants* 6 (2) : 180-188.
- Gunawan, L.W. 1988. *Teknik Kultur Jaringan*. Bogor: Laboratorium Kultur Jaringan, PAU Bioteknologi, IPB.
- Kusari S, Verma V C, Lamshoeft M, dan Spiteller M. 2012. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A.Juss. That produces azadirachtin. *World J Microbiol Biotechnol* 28:1287–1294
- Luo S, Xu T, Chen L, Chen J, Rao C, Xiao X, Wan Y, Zeng G, Long F, Liu C dan Liu Y. 2012. Endophyte-assisted promotion of biomass production And metal-uptake of energy crop sweet sorghum By plant-growth- promoting endophyte *Bacillus* sp.SLS18. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:1745–1753
- Malinowski D P, Alloush G A, dan Belesky D P. 2000. Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral up take in Tall fescue. *Plant and Soil* 227: 115–126
- Mishra A, Gond S K, Kumar A, Sharma V K, Verma S K, Kharwar R N dan Sieber T N. 2012. Season and Tissue Type Affect Fungal Endophyte Communities of the Indian Medicinal Plant *Tinospora cordifolia* More Strongly than Geographic Location. *Microb Ecol* 64:388–398
- Mng'omba S A, du Toit E S, dan Akinnifesi F K. 2007. Effective Preconditioning Methods for in vitro Propagation of *Uapaca kirkiana* Muell Arg. Tree Species. *African Journal of Biotechnology*. 6(14) : 1670-1676
- Mousavi E S, Behbahani M, Hadavi E, dan Miri S M. 2012. Callus Induction And Plant Regeneration In *Lisianthus* (*Eustoma Grandiflorum*). *Trakia Journal Of Sciences* 10 (1) : 22-25.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Pirttila A M, Podolich O, Koskima J J, dan Hohtola A. 2008. Role of origin and endophyte infection in browning Of bud-derived tissue cultures of Scot spine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant Cell Tiss*

- Organ Cult* 95:47–55
- Purwantiningsih, Hakim AR, Purwantini I. 2010. Antihyperuricemic Activity of the Kepek [Stelechocarpus burahol (Bl.) Hook. F. & Th.] Leaves Extract and Xanthine Oxidase Inhibitory Study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2 (2) :123-127
- Puspita Y D, Sulistyowati L, dan Djauhari S. 2013. Eksplorasi Jamur Endofit Pada Tanaman Jeruk (Citrus sp.) Fusiprotoplas Dengan Ketahanan Berbeda Terhadap Botriodiplodia theobromae Pat. *Jurnal HPT Volume 1 Nomor 3*
- Silva A L C, Caruso C S, Moreira R D A, dan Horta A C G. In Vitro Induction Of Callus From Cotyledon And Hypocotyl Explants Of Glycine wightii (Wight & Arn.) Verdc. 2003. *Ciênc. agrotec., Lavras*. 27 (6) :1277-1284
- Sunardi C. 2010. Structure of Steroids in Stelechocarpus burahol Hook F. & Thomson Stem Bark. *The Journal of Indonesian Medicinal Plant*. 3 (2).
- Sunarto, AT. 1999. *Stelechocarpus burahol* Hook.F & Thompson. In : de Padua, L.S., Bunyapraphatsara, N. And Lemmens, R.H.M.J. (Editors) : *Plant Resources of South-East Asia No. 12(1). Edible fruits and nuts plants*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherland. Pp.290-291.
- Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 5, 535–544.
- Taechowisan T, Wanbanjob A, Tuntiwachwuttikul P, Taylor W C. 2006. Identification of Streptomyces sp. Tc022, an endophyte in Alpinia galanga, and the isolation of actinomycin D. *Annals of Microbiology*, 56 (2) 113-117
- Tisnadajaja D, Saliman E, Silvia, Simanjuntak P. 2006. Study of burahol (Stelechocarpus burahol (Blume) Hook & Thomson) as an anti-oxidative compounds containing fruit. *Biodiversitas*. 7 (2): 199-209
- Thomas P. 2004. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue Cultures . *Curr Sci* 87:67–72
- Wardani D P, Solicahtun, dan Setyawan A D. 2003. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus Talinum paniculatum Gaertn. pada Variasi Penambahan Asam 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) dan Kinetin. *Biofarmasi* 2 (1): 35-43