

# Sterilisasi Permukaan untuk Mengisolasi Fungi Endofit Akar pada Meranti Tembaga (*Shorea leprosula* Miq.) di Hutan Penelitian Dramaga

## *Surface Sterilization to Isolate Fungal Root Endophytes of Meranti Tembaga (Shorea leprosula Miq.) in Dramaga Experimental Forest*

Safinah S. Hakim<sup>1</sup>, Sri Wilarso Budi<sup>1</sup>, Maman Turjaman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Silviculture, Fakultas Kehutanan IPB

<sup>2</sup>Badan Litbang Kehutanan Gunung Batu, Bogor

### ABSTRACT

Root fungal endophyte were isolated from seedling of Meranti Tembaga (*Shorea leprosula* Miq.) taken from Dramaga experimental Forest, Bogor with five difference surface sterilization methods. Recommended surface sterilization to isolate root fungal endophyte was performed by following immersion process : 96% ethanol for 1 min, 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 3 min, 96% ethanol for 0.5 min, and rinse with sterile water for 5 min. Endophyte frequency was low (6-11%) and four morphological types of fungi were found during this research.

**Keywords:** root fungal endophyte, surface sterilization, *Shorea* sp.

### PENDAHULUAN

Secara alami, hampir 90% tanaman berinteraksi dengan mikroorganisme tanah (Das dan Varma, 2009). Berdasarkan hasil berbagai penelitian, interaksi antara tanaman dan mikroorganisme tanah memberikan beberapa keuntungan pada tanaman antara lain meningkatkan kemampuan penyerapan unsur hara tanaman, meningkatkan biomass tanaman, meningkatkan kemampuan tanaman di kondisi cekaman, dan lain-lain (Hryniewicz dan Baum, 2011; Bonkowski *et al.*, 2000). Pada tanaman kehutanan Indonesia, penelitian tentang interaksi tanaman dan mikroorganisme tanah telah banyak dilakukan, terutama tentang mikoriza (Santoso *et al.*, 2006). Tidak seperti mikoriza, interaksi antara fungi endofit dengan tanaman kehutanan Indonesia belum banyak dieksplorasi.

Fungi endofit adalah fungi yang hidup di dalam tanaman inang tanpa menimbulkan gejala penyakit serta memiliki ikatan yang kuat dengan tanaman dan menunjukkan efek terhadap fungsional tanaman serta kemampuan hidup tanaman (Bayman, 2007). Fungi endofit pada akar sangat berlimpah (Schulz dan Boyle, 2006) dan memberikan berbagai pengaruh terhadap tanaman antara lain menghasilkan metabolit sekunder yang secara *in vitro* berfungsi sebagai antibakteri, biofungisida, dan kandungan herbal yang bermanfaat bagi kesehatan meningkatkan pertumbuhan tanaman, menekan penyakit pada tanaman, dan meningkatkan toleransi tanaman inang terhadap toleransi kondisi stress lingkungan (Schulz, 2006).

Dipterocarpaceae merupakan salah satu jenis pohon yang sangat terkenal di kawasan tropis. Dipterocarpaceae memegang peranan penting dalam perdagangan kayu dunia dan juga memainkan peran penting dalam perekonomian beberapa negara di

kawasan Asia Tenggara (Appanah dan Turnbull, 1998). Kontribusi tinggi jenis-jenis pohon Dipterocarpaceae ini terhadap perekonomian berdampak pada kelestarian jenis ini di Alam. Permintaan yang tinggi akan jenis ini di pasaran perdagangan kayu dunia menyebabkan eksploitasi berlebihan pada jenis ini (Lee, 2000).

Terancamnya keberlangsungan pohon dari family Dipterocarpaceae tidak hanya mengancam keberlangsungan spesies ini sendiri, tetapi juga mengancam seluruh ekosistem yang terdapat di hutan tersebut karena pohon-pohon jenis Dipterocarpaceae berperan sebagai habitat dan sumber pakan bagi satwa liar yang hidup di hutan. Kondisi jenis-jenis Dipterocarpaceae yang terdegradasi mendorong studi yang berhubungan dengan upaya penanaman kembali dan teknik silvikulturnya yang juga mendorong dilakukannya studi akan hubungan jenis ini dengan berbagai jenis fungi.

Studi tentang Fungi Endofit pada pohon jenis-jenis Dipterokarpa belum banyak dipelajari. Orachaiupunlap *et al.*, (2009) mempelajari keanekaragaman fungi endofit yang diisolasi dari daun tiga jenis pohon dipterokarpa. Dari studi tersebut, 40 morfotaksa berhasil diidentifikasi. Studi tentang fungi endofit akar sendiri masih belum ditemukan. Oleh karena itu penelitian ini akan menjadi penelitian dasar tentang fungi endofit akar pada jenis tanaman dipterokarpa khususnya jenis *Shorea* sp.

Ada empat cara yang bisa dilakukan untuk mempelajari fungi endofit akar pada tanaman yakni a) pengamatan secara mikroskopis b) isolasi dengan sterilisasi permukaan di kultur murni c) metode molekular d) metode biokimia (Bayman, 2007). Dari keempat metode tersebut, metode sterilisasi permukaan merupakan metode yang paling sederhana, murah, serta diketahui bisa mendeteksi berbagai jenis fungi. Tujuan

penelitian adalah untuk mengetahui bagaimana metode sterilisasi permukaan yang terbaik dalam mengisolasi fungi endofit akar pada Meranti Tembaga (*Shorea leprosula* Miq.) yang terdapat di Hutan Penelitian Dramaga, Bogor.

## BAHAN DAN METODE

### Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Hutan Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan, Gunung Batu, Bogor. Sampel penelitian diambil di Hutan Penelitian Dramaga. Penelitian dilakukan selama 3 bulan, yakni pada September hingga November 2013.

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah akar dari anakan *S.leprosula*, sekop, air steril, etanol, hidrogen peroksida, *plastic wrap*, kertas, tisu, kertas label, media Malt Extract dan Agar. Alat yang digunakan terdiri dari petri dish, *cutter*, gelas piala, autoklaf, timbangan analitik, mikroskop, *hand sprayer*, *Laminar Air Flow*, dan *timer*.

### Metode Kerja

#### Pengambilan Sampel Akar

Fungi endofit akar diisolasi dari akar anakan *Shorea leprosula* yang sehat dengan tinggi anakan sekitar 20-50 cm. Anakan dengan seksama digali dari tanah, dibungkus dengan tisu yang telah dibasahi, dan

dimasukkan ke dalam plastik untuk dilakukan proses selanjutnya pada hari yang sama di laboratorium.

### Sterilisasi permukaan

Sterilisasi permukaan yang mengacu pada metode Ahlich dan Sieber (1996) yang dimodifikasi untuk mengetahui hasil terbaik untuk mengisolasi fungi endofit akar *Shorea leprosula*. Sebelum dilakukan sterilisasi permukaan, akar lateral diambil, dicuci dengan air mengalir hingga seluruh tanah yang menempel pada akar bersih. Jika perlu digunakan sikat halus untuk membersihkan permukaan akar. Proses selanjutnya adalah perendaman ke dalam beberapa larutan yang diurai pada tabel 1 yang dilakukan di bawah *Laminar Air Flow*. Selanjutnya akar dikeringanginkan dan dipotong menjadi segmen berukuran 0.5-1 cm.

### Isolasi

Segmen akar dipindahkan ke Malt Extract Agar 1% (10 g/L ME dan 20 g/L agar) yang merupakan media yang umum digunakan untuk isolasi fungi endofit (Arnold, 2001). Inkubasi dilakukan pada suhu ruangan. Lama inkubasi bervariasi, tergantung pada kecepatan pertumbuhan fungi. Jika pada masa inkubasi terdapat fungi yang muncul pada ujung segmen akar, fungi tersebut dipindahkan ke MEA 1%.

### Pengamatan dan pengambilan data

Selama proses inkubasi, diamati pertumbuhan fungi, persentase kemunculan strain, dan banyaknya segmen akar yang berkolonisasi dengan fungi endofit akar.

Tabel 1 Perlakuan sterilisasi permukaan

No	Perendaman ke-	Jenis perlakuan (% larutan ; menit)				
		A	B	C	D	E
1	EtOH	96; 1	70; 1	96; 1	96;0.5	96; 1
2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35; 5	15; 4	25;3	25;4	20; 3
3	EtOH	96;0.5	70; 1	96;0.5	96;0.5	96; 1
4	H <sub>2</sub> O	- ; 5	-; 5	-; 5	-; 5	-; 5
5	H <sub>2</sub> O	-; 5	-; 5	-	-	-

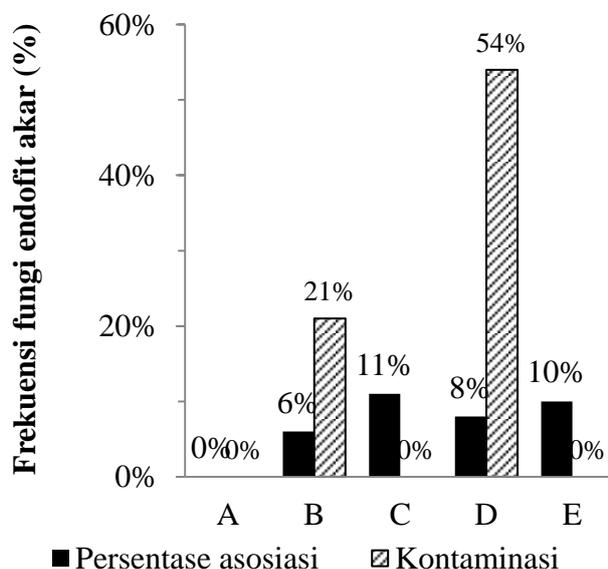
## HASIL

Hasil pengamatan sterilisasi permukaan akar *Shorea leprosula* untuk mendapatkan fungi endofit akar dengan lima perlakuan perendaman yang berbeda menunjukkan frekuensi asosiasi fungi endofit pada segmen akar adalah antara 6% hingga 10% (Gambar 2). Adanya asosiasi dapat diamati dengan melihat adanya fungi yang tumbuh dari irisan segmen yang diletakkan di MEA 1% (Gambar 1). Pada tahap sterilisasi ini, dijumpai juga kontaminasi dengan persentase 0% hingga 54%. Kontaminasi terbanyak dijumpai pada perlakuan sterilisasi permukaan D yakni 54%.



Gambar 1. Hifa Fungi Endofit yang muncul dari ujung segmen akar Meranti Tembaga

Pada setiap perlakuan, diperoleh beberapa jenis isolat yang diberi kode berdasarkan jenis perlakuan yang disajikan dalam tabel 2. Pada perlakuan A, tidak diperoleh fungi yang berasosiasi dengan segmen akar yang telah disterilasi. Pada perlakuan sterilisasi permukaan D, diperoleh jumlah asosiasi paling banyak dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hasil pengamatan pada isolat yang telah diisolasi menunjukkan bahwa isolate-isolat tersebut beberapa memiliki kemiripan, yang diklasifikasikan menjadi empat jenis (Tabel 3). Isolat WF dengan ciri morfologis pertumbuhan koloni *irregular*, *raised*, dan *curled* paling banyak dijumpai. Sedangkan pada jenis perlakuan sterilisasi permukaan yang berbeda jenis dengan ciri morfologi *circular*, *flat*, dan *filiform* bisa dilihat muncul dari segmen akar yang ditumbuhkan pada media MEA 1%.



Gambar 2 Persentase asosiasi fungi endofit akar dan kontaminasi pada segmen akar *S. leprosula* dengan lima metode sterilisasi permukaan

Tabel 2 Isolat yang diisolasi pada sterilisasi permukaan dengan lima perlakuan

No	Kode Perlakuan	Kode Isolat
1	A	NA
2	B	B25,B35, B39
3	C	C17,C26,C12
4	D	D3,D4
5	E	E40,E47,E3, E10, E25

Tabel 3 Pengelompokan isolat berdasarkan kemiripan morfologi

No	Kode Isolat	Asal Isolat	Karakteristik
1	WF	C12, B39, D4, B25,	Circular, miselia putih, filiform
2	WT	D3, C26, E47, E10, E3, E25	Irregular, raised, curled, miselia putih
3	BF	C17	Circular, convex, miselia coklat kehitaman
4	YF	E40	Circular, miselia hijau kekuningan

Berdasarkan hasil di atas, diketahui bahwa metode sterilisasi A yang merupakan metode yang diambil dari Ahlich dan Sieber (1996) tidak bisa digunakan untuk mengisolasi endofit pada akar *Shorea sp.* Hasil terbaik adalah metode sterilisasi C dan E dengan jumlah presentase kolonisasi masing-masing sebesar 11% dan 10% serta presentase kontaminasi sebesar 0%. Kontaminasi yang dijumpai pada umumnya berupa *Trichoderma sp.* yang ditandai dengan spora berwarna hijau dan pertumbuhan yang cepat.

PEMBAHASAN

Meranti merupakan tanaman kehutanan yang diketahui memiliki interaksi yang tinggi dengan mikoriza, terutama jenis ektomikoriza (Lee, 1998). Penelitian ini berhasil menunjukkan, bahwa selain berinteraksi dengan ektomikoriza, akar meranti juga dapat berinteraksi dengan fungi endofit akar. Hal ini sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa fungi endofit jumlahnya sangat melimpah di alam (Schulz et al., 2006). Interaksi antara fungi endofit dengan inang bersifat luas dan dapat dijumpai pada berbagai jaringan tanaman dan menginfeksi tanaman melalui stomata, dinding sel, ataupun luka pada jaringan taman (Bayman, 2007).

Adanya endofit yang muncul pada tanaman yang umumnya berasosiasi dengan ektomikoriza sudah banyak diteliti. Wagg et al (2008) pada penelitiannya berhasil menunjukkan adanya jenis-jenis pinus yang berasosiasi dengan ektomikoriza, fungi mikoriza arbuskula, serta *Dark Septate Endophyte* (DSE). Fungi Mikoriza serta *Dark Septate Endophyte* berbagi habitat yang sama, tetapi bagaimana mekanisme bagaimana cara mendapatkan sumber nutrisi belum banyak diketahui (Reininger dan Sieber, 2013).

Sterilisasi permukaan dengan metode perendaman di berbagai larutan merupakan metode yang paling umum dilakukan serta berhasil mengisolasi fungi endofit akar (Schulz et al., 1993 ; Bayman, 2007; Silvani et al.,2008). Pada penelitian ini digunakan metode sterilisasi permukaan yang digunakan oleh Achlich dan Sieber (1996). Alkohol berfungsi sebagai larutan yang membahasahi jaringan tanaman (Schulz et al., 1993) . Hidrogen peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) merupakan larutan yang berfungsi untuk mengoksidasi permukaan akar serta membunuh jamur maupun bakteri yang ada. Selanjutnya digunakan lagi etanol dan air steril untuk menghilangkan sisa-sisa larutan yang ada pada permukaan akar.

Hidrogen peroksida dan ethanol merupakan larutan yang paling umum digunakan dalam sterilisasi permukaan. Namun, Selain penggunaa hydrogen peroksida, terdapat beberapa larutan yang lain yakni Sodium Hypochloride (Schulz et al.,1993; Silvani et al., 2008) . Sterilisasi permukaan dengan menggunakan metode A yang merupakan metode yang sama dengan yang digunakan oleh Achlich dan Sieber (1996) untuk mengisolasi fungi endofit akar pada berbagai jenis tanaman berkayu serta semak, tidak bisa digunakan untuk mengisolasi fungi endofit akar pada Meranti tembaga. Kondisi ini diduga karena seluruh organisme baik yang diinginkan ataupun tidak diinginkan mati

akibat konsentrasi larutan yang terlalu kuat. Pada metode B, konsentrasi etanol (70%) dan hydrogen peroksida (15%) terlalu rendah, diperkirakan masih ada mikroorganisme yang tidak diharapkan di permukaan segmen yang memicu munculnya kontaminasi. Pada metode D, waktu perendaman terlalu singkat sehingga masih memungkinkan adanya kontaminasi.

Metode C dan E menunjukkan hasil isolasi tanpa kontaminasi serta persentase kemunculan fungi endofit yang lebih besar dibanding dengan metode lain. Jika kedua metode ini dibandingkan maka metode E lebih disarankan dengan alasan efektivitas penggunaan larutan karena pada metode E konsentrasi Hidrogen Peroksida lebih rendah. Hasil percobaan dan studi literatur yang telah dilakukan menunjukkan bahwa keefektifan metode sterilisasi baik konsentrasi larutan maupun waktu perendaman akan memberikan hasil berbeda pada inang yang berbeda.

Persentase fungi endofit yang berhasil diisolasi pada penelitian ini berkisar 6% hingga 11%. Jumlah ini sangat kecil jika dibandingkan dengan isolasi yang dilakukan pada jenis-jenis pohon di wilayah subtropik, salah satunya oleh Achlich dan Sieber (1996) yang menunjukkan 70-100% segmen akar beberapa jenis pohon dan semak berasosiasi dengan fungi endofit akar. Isolasi fungi endofit pada daun dan batang dari *Betula platyphylla* (Betulaceae), *Quercus liaotungensis* (Fagaceae), dan *Ulmus macrocarpa* (Ulmaceae) menunjukkan persentase infeksi sebesar 48.5-65.6% (Sun *et al.*, 2012).

Pada tanaman kehutanan, fungi endofit yang berasosiasi merupakan jenis fungi *Non-clavicipitaceous* yang dicirikan dengan kisaran inang yang luas, menginfeksi akar dan tunas, dan menyebar secara vertikal dan horizontal (Rodriguez *et al.*, 2008). Studi yang lebih spesifik, menyebutkan bahwa komunitas fungi endofit pada tanaman angiospermae umumnya didominasi oleh jenis Diaporthales dan pada Gymnospermae didominasi oleh fungi Helotiales (Sieber, 2007).

Jumlah spesies yang terdeteksi dalam studi fungi endofit sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain faktor biotik, faktor abiotik, inang, fase tanaman, edafis dan klimatis (Sieber, 2007). Di tanaman sendiri, jenis endofit serta frekuensi fungi endofit yang terdapat di dalamnya dipengaruhi oleh zat-zat metabolit yang dikandung inang (Bayman, 2007). Pada penelitian ini, rendahnya persentase asosiasi pada sampel diduga dikarenakan oleh sifat fungi endofit yang berinteraksi dengan akar meranti tembaga ini spesifik. Kombinasi jenis larutan untuk sterilisasi permukaan serta media untuk inkubasi sangat diperlukan dalam skala penelitian yang lebih luas agar diperoleh hasil yang lebih maksimal.

## KESIMPULAN

1. Terdapat fungi endofit yang berasosiasi dengan akar meranti tembaga (*Shorea leprosula*)
2. Sterilisasi permukaan dengan mencelupkan segmen akar pada etanol 96% (1 menit), hydrogen peroksida 20% (3 menit), etanol 96% (1 menit),

dan air steril (5 menit) merupakan metode yang dianjurkan untuk mendapatkan fungi endofit akar pada *Shorea leprosula*

3. Persentase frekuensi kemunculan fungi endofit akar pada *Shorea leprosula* rendah yakni berkisar 6% hingga 11%.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan dan Konservasi Alam, Badan Litbang Kehutanan, Kementerian Kehutanan, Gunung Batu Bogor dan Tanoto Foundation atas bantuan alat, bahan serta finansial yang digunakan selama penelitian serta kepada anggota Kelompok Penelitian Mikrobiologi Hutan yang memberikan bantuan secara teknis serta saran terhadap penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achlich K dan Sieber TN. 1996. The profusion of dark septate endophytic fungi in non-ectomycorrhizal fine roots of forest trees and shrubs. *New Phytol* 132 : 259-270.
- Arnold AE; Maynar Z; Gilbert GS. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees : patterns of abundance and diversity. *Mycol* 105 (12): 1502-1507.
- Bayman P. 2007. Fungal endophytes. Kubicek CP dan Druzhinina IS, editor. *Environmental and Microbial Relationship 2nd Edition*. Verlag Berlin Heidelberg : Springer.
- Bonkowski M, Cheng W, Griffiths BS, Alpehi J, Scheu S. 2000. Microbial-fauna interactions in the rhizosphere and effect on plant growth. *European Journal of Soil Biology* 36 : 135-147.
- Das A dan Varma A. 2009. *Symbiosis : the art of living*. a varma dan kharkwal ac, editor. symbiotic fungi. Verlag Berlin Heidelberg : Springer.
- Hrynkiwicz, K dan Baum, C. 2011. The potential of rhizosphere microorganisms to promote the plant growth in disturbed soils. A. Malik, E. Grohmann (eds.), *environmental protection strategies for sustainable development, strategies for sustainability*. Verlag Berlin Heidelberg : Springer.
- Lee SS. 1998. *Root symbiosis and nutrition*. Appanah S and Turnbull JM (eds.). 1998. *A Review of Dipterocarps: Taxonomy, ecology and Silviculture*. Bogor : CIFOR.
- Orachapupnlap K; Roengsumran S; Sihanonth P. 2009. Diversity of endophytic fungi isolated from plant leaves of deciduous dipterocarp forest in tak province. *Kasetsart Journal* 43: 182-188.
- Rehnlnger V dan Sieber TN. 2013. Mitigation of antagonistic effects on plant growth due to root co-colonization by dark septate endophytes and

- ectomycorrhiza. *Environmental Microbiology Reports* 5 (6) : 892-898.
- Rodriguez RJ, White Jr JE, Arnold AE, Redman RS. 2008. Fungal endophytes : Diversity and Functional roles. *New Phytologist* 182: 314-330.
- Santoso, E; Turjaman, M; Irianto RSB. 2006. Aplikasi mikoriza untuk meningkatkan kegiatan rehabilitasi hutan dan lahan terdegradasi. Proceeding in: Ekspose hasil Penelitian Konservasi dan Rehabilitasi Sumberdaya Hutan. Forestry Research and Development Ministry of Forestry Indonesia.
- Schulz, B dan Boyle C. 2006. What are endophytes?. Schulz, B; Boyle C dan Sieber TN, editor. *Microbial root endophytes*. Verlag Berlin Heidelberg: Springer
- Schulz B; Wanke U; Draeger S; Aust HJ. 1993. Endophytes from herbaceous plant and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycol Res* 97: 1447-1450
- Sieber TN. 2007. Endophytic fungi in forest trees : are they mutualist ?. *Fungal Biology Review* 20 : 75-89.
- Silvani VA; Fracchia S; Fernandez L; Pergola M; Godeas A. 2008. A simple method to obtain microorganism from fiels-collected roots. *Soil Ecology and Biochemistry* 40 : 1259-1263.
- Sun X; Ding Q; Hyde KD; Guo LD. 2012. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal Ecology* 5 : 624-632.
- Wagg C; Pautler M; Massicotte HB; Peterson L. 2008. The co-occurrence of Ectomycorrhizal, arbuscular mycorrhizal, and dark septate fungi in seedling of four members of the Pinaceae. *Mycorrhiza* 18: 103-110.