

Optimization of Andalas Leaf Tissue Surface Sterilization (*Morus macroura* Miq.) with NaOCl for Endophytic Microbial Isolation

Optimasi Sterilisasi Permukaan Jaringan Daun Andalas (*Morus macroura* Miq.) dengan NaOCl untuk Isolasi Mikroba Endofit

Nurhelmi¹, Dwi Hilda Putri^{1*}

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science (FMIPA), Universitas Negeri Padang, West Sumatera, Indonesia

* Corresponding Author : dwihildaputri.08@gmail.com

Abstract. *Morus macroura* Miq. or known as Andalas has bioactive compounds. One way to obtain active compounds from Andalas plants is to isolate endophytic microbes. The existence of contamination is an obstacle to this microbial isolation process. Optimization of tissue surface sterilization is a very important first step in isolating endophytic microbes. One of the sterilants commonly used is sodium hypochlorite (NaOCl).

The purpose of this study was to determine the optimum concentration and time for surface sterilization of Andalas leaf tissue (*Morus macroura* Miq.) Using sodium hypochlorite (NaOCl). Optimization of Andalas leaf surface sterilization using NaOCl solution with concentrations (0.25% and 0.50%), and the sterilization time to be used (0.5, 1, 1.5, and 2 minutes). Analysis of microbial contaminants is by growing bacteria on *Nutrient Agar* (NA) medium and fungi on *Potato Dextrose Agar* (PDA) medium.

The results showed that the optimal concentration of Andalas leaf surface sterilization for the isolation of endophytic bacteria obtained an optimum concentration of 0.25% and an optimum time of 0.5 minutes, and a concentration of 0.50% with an optimum time of 1 minute, while for endophytic fungi on leaves Andalas obtained a concentration of 0.255 and 0.50% with an optimum time of 0.5 minutes.

Key words: *Andalas leaves, endophytic microbes, surface sterilization, sodium hypochlorite (NaOCl), contamination*

Abstrak. *Morus macroura* Miq. atau dikenal dengan nama Andalas memiliki senyawa bioaktif. Salah satu cara untuk mendapatkan senyawa aktif dari tumbuhan Andalas adalah dengan mengisolasi mikroba endofit. Adanya kontaminasi merupakan kendala pada proses isolasi mikroba ini. Optimasi sterilisasi permukaan jaringan merupakan langkah awal yang sangat penting dalam mengisolasi mikroba endofit. Salah satu bahan sterilan yang umum digunakan adalah menggunakan natrium hipoklorit (NaOCl).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi dan waktu optimum untuk sterilisasi permukaan jaringan daun Andalas (*Morus macroura* Miq.) yang menggunakan natrium hipoklorit (NaOCl). Optimasi sterilisasi permukaan daun Andalas menggunakan larutan NaOCl dengan konsentrasi (0,25% dan 0,50%), dan waktu sterilisasi yang akan digunakan (0,5, 1, 1,5, dan 2 menit). Analisis mikroba kontaminan yaitu dengan bakteri

ditumbuhkan pada medium *Nutrient Agar* (NA) dan jamur pada medium *Potato Dextrosa Agar* (PDA).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa optimasi konsentrasi sterilisasi permukaan daun Andalas untuk isolasi bakteri endofit diperoleh hasil konsentrasi optimum 0,25% dan waktu optimum selama 0,5 menit, dan konsentrasi 0,50% dengan waktu optimum selama 1 menit, sedangkan untuk jamur endofit pada daun Andalas diperoleh hasil konsentrasi 0,25% dan 0,50% dengan waktu optimum selama 0,5 menit.

Kata kunci: Daun Andalas, mikroba endofit, sterilisasi permukaan, natrium hipoklorit (NaOCl), kontaminasi



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2020 by author.

Pendahuluan

Tumbuhan Andalas (*Morus macroura* Miq.) merupakan maskot flora dari daerah Sumatera Barat. Tumbuhan ini sebagai flora maskot Sumatera Barat berkaitan dengan peranan dalam kehidupan dan budaya masyarakat Minangkabau (Tang dkk., 2008). Menurut Hakim (2008), Andalas merupakan tumbuhan yang memiliki beberapa jenis senyawa aktif antimikroba, seperti turunan *stilben* (*oksiresveratrol* dan *andalisin A*), turunan *2-arilbenzouran*, *morasin M* dan turunan *kumarin* (*umbeliferon* dan β -*resolsilaldedid*). Menurut Soekamto dkk., (2003), kandungan senyawa aktif yang dimiliki oleh Andalas, menjadikan tumbuhan Andalas memiliki kemampuan sebagai tumbuhan herbal.

Keberadaan tumbuhan Andalas saat ini sudah menjadi langka (Fajrina dkk., 2012). Hal ini disebabkan oleh faktor endogen yaitu sulit melakukan perbanyakannya secara generatif dan faktor eksogen (lingkungan yang kritis dan ekstrim) yang menyebabkan sulitnya dalam pertumbuhannya dan perkembangannya (Swandra dkk., 2012). Salah satu upaya dalam mengatasi kelangkaan tumbuhan Andalas, namun tetap dapat menggali potensi yang dimiliki, khususnya dalam pemanfaatan tumbuhan ini yaitu dengan mengisolasi mikroba endofitnya. Mikroba endofit dapat dijadikan alternatif untuk mendapatkan senyawa aktif tanpa mengesktrak secara langsung dari tumbuhan. Menurut Taechowisan dkk., (2006), sebagian besar tumbuhan merupakan inang bagi satu atau lebih mikroorganisme endofit. Mikroba endofit yang sudah masuk ke dalam jaringan tanaman akan menembus penghalang endodermal atau pita kaspary dan menginvasi pembuluh xilem (Blanco, 2014).

Salah satu tahapan penting dalam mengisolasi mikroba endofit dari tumbuhan adalah proses sterilisasi permukaan jaringan. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan mikroba kontaminan yang terdapat pada permukaan jaringan tumbuhan. Permukaan jaringan tumbuhan terpapar dengan lingkungan, sehingga hal ini menyebabkan kemungkinan kontaminasi mikroba dari lingkungan (udara, tanah dan sumber lainnya) cukup besar (oyebanji dkk., 2009). Menurut Zulkarnain (2009), sumber kontaminasi pada permukaan tumbuhan yang paling sulit dikendalikan adalah mikroorganismenya.

Beberapa bahan kimia yang dapat digunakan untuk sterilisasi permukaan tumbuhan adalah clorox, natrium hipoklorit (NaOCl) dan alkohol (Fitriani, 2019). Salah satu bahan sterilan yang umum digunakan adalah NaOCl karena dapat membunuh berbagai macam tipe bakteri, jamur dan virus (Yildiz dan Er, 2002). Natrium hipoklorit memiliki pH yang tidak stabil, bersifat toksik, namun tidak merusak jaringan. Senyawa ini umum digunakan sebagai agen sterilisasi dalam berbagai teknik sterilisasi permukaan dengan konsentrasi dan lama perendaman yang berbeda-beda (olowe dkk., 2014). Konsentrasi NaOCl yang digunakan bervariasi tergantung tanaman yang digunakan (Mousavi dkk., 2012, Wardani dkk., 2003).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui konsentrasi dan waktu optimum untuk sterilisasi permukaan jaringan daun Andalas (*Morus macroura* Miq.) menggunakan natrium hipoklorit (NaOCl).

Bahan dan Metode

Pengambilan Sampel

Sampel daun Andalas diambil di daerah Nagari Andaleh, Kecamatan Batipuah, Kabupaten Tanah Datar, Sumatera Barat. Daun yang diambil adalah daun muda (daun ke-3 teratas dari pucuk daun). Daun yang sudah diambil, dimasukkan ke dalam botol steril, kemudian dimasukkan ke dalam ice box dan selanjutnya dibawa ke laboratorium.

Sebelum proses sterilisasi permukaan, sampel daun dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan partikel tanah dan kotoran yang menempel. Jaringan daun kembali dimasukkan ke dalam botol steril dan disimpan di suhu 4°C sampai akan digunakan.

Sterilisasi Permukaan

Jaringan daun tumbuhan Andalas dipotong dengan ukuran 1x1 cm. Untuk penelitian ini potongan jaringan daun dibuat sebanyak 64 potongan. Sebelum sterilisasi permukaan, potongan jaringan daun tumbuhan Andalas dicuci dengan aquadest steril secara terpisah. Cuplikan air bekas pencucian diambil sebanyak 1mL, kemudian dimasukkan ke dalam tabung endpod dan disimpan pada suhu 4°C sampai akan digunakan untuk proses pengamatan (C0).

Sebelum perlakuan sterilisasi permukaan, jaringan terlebih dahulu direndam dengan alkohol 70% selama 30 detik. Selanjutnya, jaringan dikeringkan dengan menggunakan tisu steril. Proses perlakuan sterilisasi permukaan jaringan dilakukan dengan cara merendam jaringan daun dalam larutan NaOCl dengan konsentrasi (0,25% dan 0,50%). Masing-masing cawan petri berisi 8 potongan jaringan daun tumbuhan Andalas. Setiap 30 detik diambil 2 potongan jaringan daun Andalas, dan dicuci dengan aquadest steril. Cuplikan air bekas pencucian diambil sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung endpod dan disimpan pada suhu 4°C sampai akan digunakan untuk proses pengamatan (C1). Jaringan yang sudah dicuci selanjutnya dikeringkan diatas kertas tisu steril untuk selanjutnya diinokulasikan diatas medium agar. Perlakuan ini dilakukan setiap 30 detik berikutnya (1 menit, 1,5 menit dan 2 menit).

Analisis Data

Keberadaan koloni bakteri/jamur pada air yang digunakan untuk mencuci jaringan (C0 dan C1) serta pertumbuhan koloni bakteri disekelilingi jaringan dianalisis secara deskriptif. Kondisi sterilisasi optimum (konsentrasi dan waktu pemaparan NaOCl) dinyatakan dengan konsentrasi terendah dimana tidak ditemukan pertumbuhan bakteri/jamur pengkontaminan pada air pencucian jaringan, namun ditemukan pertumbuhan koloni mikroba disekitar jaringan). Data ditampilkan dalam bentuk tabel dan gambar.

Hasil dan pembahasan

1. Isolasi Bakteri Endofit dari Jaringan Daun

Sterilisasi permukaan bakteri endofit pada jaringan daun Andalas dilakukan dengan menggunakan konsentrasi yang berbeda (0,25% dan 0,50%) dan waktu bervariasi (0,5 menit, 1 menit, 1,5 menit dan 2 menit). Hasil sterilisasi permukaan jaringan daun Andalas dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Optimasi Sterilisasi Permukaan Jaringan Daun Andalas untuk Isolasi Bakteri Endofit

Konsentrasi NaOCl	Sumber Bahan	Waktu (menit)				
		0	0,5	1	1,5	2
0,25%	Air pencucian	+	-	-	-	-
	Bakteri endofit pada jaringan daun		+	+	+	+
0,50%	Air pencucian	+	+	-	-	-
	Bakteri endofit pada jaringan daun		+	+	-	-

Keterangan : -Koloni Tumbuh (+) -  Konsentrasi dan Waktu Optimum
 - Koloni Tidak Tumbuh (-)

Berdasarkan data pada Tabel 1. Dapat dilihat bahwa keberadaan bakteri pengkontaminan (disolasi dari air pencucian) hanya ditemukan sebelum dilakukan proses sterilisasi permukaan menggunakan NaOCl, setelah dilakukan sterilisasi permukaan selama 0,5 menit tidak ditemukan lagi bakteri pengkontaminan pada jaringan konsentrasi 0,25%, kemudian bakteri endofit pada jaringan daun 0,25% masih ditemukan pada perendaman dengan NaOCl sampai menit ke-2. Namun pada konsentrasi 0,50% bakteri pengkontaminan yang dilakukan pada proses sterilisasi permukaan sudah tidak ditemukan lagi pada waktu 1 menit. Bakteri endofit pada konsentrasi 0,50% hanya ditemukan pada perendaman 0,5 menit dan 1 menit, kemudian pada perendaman lebih dari 1 menit tidak ditemukan lagi bakteri endofit pada jaringan

daun. Berdasarkan hal tersebut maka penggunaan konsentrasi optimum yang digunakan untuk sterilisasi permukaan pada jaringan daun Andalas adalah 0,25% dengan waktu optimum selama 0,5 menit sedangkan untuk konsentrasi 0,50% waktu optimunya selama 1 menit dapat dilihat pada Tabel 1. yang ditandai dengan baris berwarna biru.

Konsentrasi NaOCl	Sumber Bahan	Waktu (menit)				
		0	0,5	1	1,5	2
0,25%	Air Pencucian					
	Bakteri endofit pada jaringan daun					
0,50%	Air Pencucian					
	Bakteri endofit pada jaringan daun					

Gambar 1. Hasil Optimasi Sterilisasi Permukaan Jaringan Daun Andalas untuk Isolasi Bakteri Endofit

2. Isolasi Jamur Endofit dari Jaringan Daun

Sterilisasi permukaan jamur endofit pada jaringan daun Andalas dilakukan dengan konsentrasi dan waktu yang berbeda. Hasil sterilisasi permukaan jaringan daun Andalas dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Optimasi Sterilisasi Permukaan Jaringan Daun Andalas untuk Isolasi Jamur Endofit

Konsentrasi NaOCl	Sumber Bahan	Waktu (menit)				
		0	0,5	1	1,5	2
0,25%	Air pencucian	+	-	-	-	-
	Jamur endofit pada jaringan daun		+	+	+	+
0,50%	Air pencucian	+	-	-	-	-
	Jamur endofit pada jaringan daun		+	+	+	-

Keterangan : - Koloni Tumbuh (+) - Konsentrasi dan Waktu Optimum
 - Koloni Tidak Tumbuh (-)

Berdasarkan data pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa keberadaan jamur pengkontaminan (diisolasi dari air pencucian), sudah ditemukan sebelum dilakukan sterilisasi permukaan, pada kedua konsentrasi 0,25% dan 0,50%. Sterilisasi permukaan pada waktu 0,5 menit tidak ditemukan jamur pengkontaminan pada kedua konsentrasi tersebut. Jamur endofit pada konsentrasi 0,25% masih ditemukan pada perendaman dengan NaOCl sampai menit ke-2, sedangkan jamur endofit pada konsentrasi 0,50% hanya ditemukan sampai perendaman selama 1,5 menit, pada perendaman lebih dari waktu 1,5 menit tidak ditemukan lagi jamur endofit pada jaringan. Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa waktu 0,5 menit adalah waktu optimum dan konsentrasi 0,25% dan 0,50% untuk konsentrasi

optimumnya untuk sterilisasi permukaan jaringan daun Andalas dapat dilihat pada Tabel 2. yang ditandai dengan baris berwarna biru

Konsentrasi NaOCl	Sumber Bahan	Waktu (menit)				
		0	0,5	1	1,5	2
0,25%	Air pencucian					
	Jamur endofit pada jaringan daun					
0,50%	Air pencucian					
	Jamur endofit pada jaringan daun					

Gambar 2. Hasil Optimasi Sterilisasi Permukaan Jaringan Daun Andalas untuk Isolasi Jamur Endofit

Optimasi sterilisasi permukaan jaringan tumbuhan merupakan tahap awal isolasi mikroba endofit. Sterilisasi permukaan dilakukan untuk membunuh mikroba epifit atau mikroba yang menempel dibagian permukaan tumbuhan, sehingga koloni yang tumbuh pada permukaan medium merupakan koloni mikroba endofit, dan memperkecil adanya kontaminasi pada proses isolasi. Sterilisasi dapat dilakukan dengan berbagai bahan sterilan, salah satu bahan sterilan yang umum digunakan adalah natrium hipoklorit (NaOCl).

Penelitian ini menggunakan daun andalas untuk sterilisasi permukaan yang didapatkan konsentrasi optimum untuk bakteri endofit didapatkan konsentrasi optimum 0,25% dengan waktu selama 0,5 menit. Sebelum dilakukan proses sterilisasi permukaan ditemukan mikroba epifit pada air pencucian jaringan dikedua konsentrasi (0,25 dan 0,50%) dan pada konsentrasi 0,25% bakteri endofit ditemukan pada waktu 0,5 menit sampai waktu 2 menit, sedangkan konsentrasi 0,50% bakteri endofit ditemukan hanya pada waktu 0,5 menit sampai waktu ke 1 menit. Sedangkan untuk jamur endofit diperoleh hasil konsentrasi 0,25% dan 0,50% dan waktu optimumnya selama 0,5 menit. Sedangkan pada penelitian Shofiyani dan Hajoeningtjias (2010) yang menyatakan bahwa sterilisasi eksplan daun kencur menggunakan NaOCl 20% selama 10 menit dan alkohol 70% selama 10 menit dapat menurunkan persentase kontaminasi pada eksplan sekitar 42% dan waktu perendaman eksplan dalam senyawa kimia sterilan dengan lama waktu perendaman berkisar 5-10 menit mampu menurunkan kontaminasi.

Strobel (2003) menjelaskan mikroba endofit dapat disolasi dari jaringan akar, batang dan daun, yang paling umum ditemukan adalah jenis jamur. Mikroba endofit tumbuh sangat lambat, khususnya jamur ditandai dengan adanya karakteristik seperti kapas (Kusari dkk., 2012). Deteksi adanya jamur dan bakteri endofit dengan menanam bagian tumbuhan Andalas ke medium pertumbuhan lalu di inkubasi.

Kesimpulan

Optimasi konsentrasi sterilisasi permukaan jaringan daun Andalas untuk isolasi bakteri endofit diperoleh hasil konsentrasi optimum 0,25% dengan waktu optimum 0,5 menit, dan konsentrasi 0,50% dengan waktu optimumnya selama 1 menit. Sedangkan untuk jamur endofit pada tumbuhan Andalas diperoleh hasil konsentrasi 0,25% dan 0,50% untuk konsentrasi optimum dan waktu optimumnya didapatkan selama 0,5 menit.

Ucapan Terima kasih

Penelitian ini didanai oleh PNPB Universitas Negeri Padang melalui skema Hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT).

Daftar Pustaka

- Blanco, J. M. dan Ben J.J Ludtenberg. (2014). Biotechnological Applications of Bacterial Endophytes. *Current Biotechnology*, 3,60-75
- Fajrina, A., Idris, M., dan Surya, N. W. (2012). Penggandaan Kromosom dan Pertumbuhan Somaklonal Andalas (*Morus macroura* Miq. var *macroura*) yang Diperlakukan dengan Kolkisin. *Jurnal Biologi UNAND*, 1(1).
- Fitriani, Y., Wijana, G., dan Darmawati, I. A. P. (2019). Teknik Sterilisasi Dan Efektivitas 2, 4-D Terhadap Pembentukan Kalus Eksplan Daun Nilam (*Pogostemon cablin* Benth) IN VITRO. *Journal of Agricultural Science and Biotechnology*, 8(1), 41-52.
- Hakim, E. H., Syah, Y. M., Juliawati, L. D., dan Mujahidin, D. (2008). Aktivitas Antioksidan dan Inhibitor Tirosinase Beberapa *Stilbenoid* dari Tumbuhan *Moraceae* dan *Dipterocarpaceae* yang Potensial untuk Bahan Kosmetik. *Jurnal matematika dan Sains*, 13(2), 33-42.
- 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.
- 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.
- Olowe O, Adesoye A, Ojoba O, Amusa O, Liamngee S. (2014). Effect of sterilization and phytohormones on shoot tip culture of *Telfairia occidentalis*. *Journal of Natural Science Research* 4(2):53-58
- Oyebanji OB, Nweke O, Odebunmi O, Galadima NB, Idris MS, Nnodi UN, Afolabi AS, Oghadu GH. (2009). Simple, effective and economical explant-surface sterilization protocol for cowpea, rice, and sorghum seeds. *African Journal of Biotechnology* 8(20): 5395-5399.
- Soekanto, N. H., Achmad, S. A., Ghisalberti, E. L., Aimi, N., Hakim, E. H., dan Syah, Y. M. (2003). Beberapa Senyawa Fenol dari Tumbuhan *Morus macroura* Miq. *Jurnal Matematika dan Sains*,8(1),35-40.
- Shofiyani, A.,O.D. Hajoeningtjas. (2010). Pengaruh Sterilan Dan Waktu Perendaman Pada Eksplan Daun Kencur (*Kaemferia galanga* L) Untuk Meningkatkan Keberhasilan Kultur Kalus. *AGRITECH*, Vol. XII No. 1 Juni 2010 : 11 –29.
- Strobel, G. dan Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. *Microbiology and Molecular Biology Rievew*, 67, 491-502.
- Swandra Eron., Idrisdan M., Netty W., Surya. (2012). Multiplikasi Tunas Andalas (*Morus macroura* Miq. var. *macroura*) dengan Menggunakan Thidiazuron dan Sumber Eksplan Berbeda secara *In Vitro*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J.Bio. UA)*. Vol 1 (1) Hal 63-68.
- 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.
- Tang, Z.H., M.C. Cao, L.X. Sheng, X.F. Ma, A. Wallah and S.Y. Zhang. 2008. Seed dispersal of *Morus macroura* (*Moraceae*) by two frugivorous bats in Xishuangbanna, S.W. China. *Biotropica* 40: 130-131
- 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.
- Yildiz, M. dan C. Er. (2002). The Effect Of Sodium Hypochlorite On In Vitro Seedling Growth And Shoot Regeneration Of Flax (*Linum usitatisimum*). *Maturwissenschaften*. 89: 259 – 261.
- Zulkarnain. (2009). *Kultur Jaringan Tumbuhan; Solusi Perbanyak Tumbuhan Budidaya*. Jakarta: Bumi Aksara.