

Modifikasi Metode Preparasi Pewarnaan Akar untuk Deteksi dan Visualisasi Pembentukan Koloni Fungi Mikoriza Arbuskula (FMA)

Susan Irmayani^{1*}, Inggit Winarni²

¹*Biotech Center, LPPM - IPB University*

²*Program Studi Biologi, Universitas Terbuka*

* susan13133@gmail.com

Diterima: 20 Mei 2022 | Disetujui: 24 Agustus 2022

ABSTRAK

Pewarnaan akar bertujuan untuk memperjelas dan mempertajam gambaran FMA yang berasosiasi dengan tumbuhan pada bagian akar sehingga mempermudah dalam pengamatan dengan mikroskop cahaya. Penelitian dilakukan untuk mendapatkan metode preparasi pewarnaan akar yang efektif (cepat, aman, dan ekonomis) dan fleksibel sehingga visualisasi FMA pada akar menjadi jelas dan kontras. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah deskriptif kualitatif yang mencakup kebersihan akar dari isi sel, tekstur akar, dan kekontrasan warna, yang terdiri dari tiga perlakuan yaitu P1 (kontrol) menggunakan KOH 10% dengan pemanasan 90°C dan diikuti dengan prosedur pewarnaan Philips & Hayman (1970) yang dimodifikasi, P2 menggunakan KOH 5% dengan pemanasan pada suhu 90°C dilanjutkan dengan prosedur pewarnaan yang dimodifikasi dengan memakai HCl 1%, dan P3 menggunakan KOH 5% pemanasan pada suhu 90°C kemudian diwarnai mengikuti metode pewarnaan yang dimodifikasi dengan penggunaan cuka komersial (untuk konsumsi) sebagai pengganti HCl. Semua perlakuan menggunakan pewarna Biru Trypan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan P2 dan P3 menunjukkan hasil yang tidak berbeda dengan P1 yakni keadaan akar yang cukup bersih sehingga deteksi dan visualisasi FMA masih dapat diamati dengan baik. Metode perlakuan P3 dengan pemanasan selama 9 menit dapat menjadi metode alternatif yang efektif (cepat, aman, ekonomis) dan fleksibel; cepat karena waktu yang diperlukan 9 menit untuk pembersihan sel-sel akar, relatif aman dengan penggunaan larutan cuka komersial (vinegar) untuk menggantikan larutan HCl, ekonomis karena dapat menurunkan kebutuhan bahan KOH hingga 50%.

Kata Kunci: Biru Trypan, Fungi Mikoriza Arbuskula, pembentukan koloni, pewarnaan akar.

Modification of Root Staining Preparation Method for Detection and Visualization Colony Formation of Arbuscular Mycorrhiza Fungi (AMF)

ABSTRACT

The root staining method was used to detect the presence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and to calculate the colonization of the AMF in the roots. Optimal root staining methods not only help in the study of plant-associated mycorrhizae, but also save time and money. Root staining aims to clarify and sharpen the picture of AMF associated with plants on the roots, making it easier to observe with a light microscope. This study aims to obtain an effective (fast, safe, and economical) and flexible method of preparation of root staining so that the visualization of AMF on roots becomes clear and contrasting. The method used in this research is descriptive qualitative which includes the cleanliness of the roots from cell contents, root texture, and color contrast, which consists of three treatments, namely P₁ (control) using 10% KOH with 90°C heating and followed by the modified Philips & Hayman staining procedure (1970), P₂ using 5% KOH by heating at 90°C followed by the modified Philips & Hayman (1970) procedure using 1% HCl, and P₃ using 5% KOH heating at 90°C then stained followed the staining method of Philips & Hayman (1970) which was modified by the use of commercial vinegar as a substitute for HCl. All treatments used Trypan Blue dye. The results showed that the P₂ and P₃ treatments showed results that were not different from P₁, the state of the roots is clean enough thereby detection and visualization of AMF could still be observed properly. The P₃ treatment method with heating for 9 minutes can be an alternative method that is effective (fast, safe, economical) and flexible. It faster than common method because it takes 9 minutes for cleaning root cells, relatively safe with the use of commercial vinegar solution to replace HCl solution, and economical because it can reduce the need for KOH material up to 50% The root staining method was used to detect the presence of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) and to calculate the colonization of the AMF in the roots. Optimal root staining methods not only help in the study of plant-associated mycorrhizae, but also save time and money. Root staining aims to clarify and sharpen the picture of AMF associated with plants on the roots, making it easier to observe with a light microscope. This study aims to obtain an effective (fast, safe, and economical) and flexible method of preparation of root staining so that the visualization of AMF on roots becomes clear and contrasting. The method used in this research is descriptive qualitative which includes the cleanliness of the roots from cell contents, root texture, and color contrast, which consists of three treatments, namely P₁ (control) using 10% KOH with 90°C heating and followed by the modified Philips & Hayman staining procedure (1970), P₂ using 5% KOH by heating at 90°C followed by the modified Philips & Hayman (1970) procedure using 1% HCl, and P₃ using 5% KOH heating at 90°C then stained followed the staining method of Philips & Hayman (1970) which was modified by the use of commercial vinegar as a substitute for HCl. All treatments used Trypan Blue dye. The results showed that the P₂ and P₃ treatments showed results that were not different from P₁, the state of the roots is clean enough thereby detection and visualization of AMF could still be observed properly. The P₃ treatment method with heating for 9 minutes can be an alternative method that is effective (fast, safe, economical) and flexible. It faster than common method because it takes 9 minutes for cleaning root cells, relatively safe with the use of commercial vinegar solution to replace HCl solution, and economical because it can reduce the need for KOH material up to 50%.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungi, colony formation, root staining, trypan blue.

PENDAHULUAN

Fungi Mikoriza Arbuskula (FMA) merupakan bentuk simbiosis mutualisme antara fungi yang berasal dari tanah dengan akar tumbuhan. Interaksi FMA ditemukan pada sekitar 80% tumbuhan terrestrial dan menunjukkan kontribusi terhadap ketahanan dan daya saing tumbuhan (Smith & Read, 1997). Tumbuhan dan FMA ini terlibat dalam pertukaran hara (Brundrett, 2002). Tumbuhan menyediakan karbohidrat yang diperlukan oleh FMA dan FMA membantu tumbuhan dalam penyerapan dan mentranslokasikan unsur hara terutama P (fosfor) dari tanah ke dalam akar tumbuhan (Smith & Read, 1997).

Simbiosis antara FMA dengan akar tumbuhan membentuk struktur eksternal dan internal. Struktur eksternal merupakan struktur yang berada di luar akar, berupa spora dan hifa. Struktur yang terbentuk di dalam akar, struktur internal dapat ditemukan dalam bentuk hifa, arbuskula, spora, dan vesikula. Kekhasan dari hifa FMA adalah tidak memiliki sekat dan merupakan titik penetrasi awal serta berhubungan dengan hifa yang terdapat di luar akar (Basri, 2018). Arbuskular merupakan alat transfer nutrisi antara fungi dan tumbuhan inangnya, sedangkan vesikula berfungsi sebagai tempat cadangan makanan dan dibentuk pada ujung hifa di dalam jaringan inang.

Hubungan simbiosis antara tumbuhan dengan FMA penting dipahami, oleh karena itu struktur FMA di dalam akar harus dapat dilihat dengan jelas sehingga keberadaannya dapat dideteksi dan diukur baik secara kuantitatif maupun kualitatif. Struktur FMA tidak dapat dilihat langsung dengan mata telanjang. Kolonisasi FMA ditandai dengan keberadaan struktur FMA pada akar yang dapat dilihat jelas melalui pewarnaan dengan bahan kimia.

Metode pewarnaan akar yang banyak dilakukan oleh peneliti adalah dengan menggunakan hitam Chlorazol E (Brundett *et al.*, 1996), biru trypan (Phillips & Hayman, 1970), dan tinta biru (Vierheilig, 1998). Selain itu, metode dengan menggunakan pewarna tinta tulis, seperti tinta parker biru (Nusantara, 2011) dan tinta hitam Schaeffer (Sulfiah, 2012) juga dapat digunakan, bahkan menunjukkan hasil yang cukup baik.

Metode pewarnaan FMA yang paling banyak diterima dan diikuti adalah metode dari Phillips & Hayman (1970), yang diawali dengan fiksasi akar dalam Formaldehid-asam asetat-etanol (FAA), kemudian pembersihan dengan KOH 10% pada suhu 90°C selama 1 jam kemudian dibilas dengan air kran dan dilanjutkan dengan memberi larutan HCl 2%, dan langkah terakhir diwarnai dengan biru trypan 0.05% dalam lactophenol pada suhu ruang selama 5 menit. Namun teknik pewarnaan dari Phillips & Hayman (1970) menggunakan pewarna biru trypan. Larutan KOH, H₂O₂, dan HCl adalah bahan kimia yang dapat mengiritasi kulit jika kontak langsung dan uapnya dapat mengiritasi mata, hidung, tenggorokan, dan paru-paru (Pohanish dalam Yon, dkk, 2015). Oleh karena itu pengurangan konsentrasi dan substitusi bahan-bahan tersebut dengan bahan lain yang lebih aman dan ekonomis perlu dilakukan. Selain itu, metode pewarnaan Phillips & Hayman (1970) yang dimodifikasi, memerlukan waktu yang cukup lama, yakni 96 jam, sampai akar dapat dibuat preparat dan diamati di bawah mikroskop. Waktu tersebut sangat lama, oleh karena itu diperlukan modifikasi metode agar waktu yang diperlukan untuk preparasi pewarnaan akar menjadi lebih cepat dengan hasil pewarnaan optimal. Atas dasar inilah dilakukan penelitian terhadap penyempurnaan metode pewarnaan, melalui modifikasi penggunaan larutan yang lebih aman dikaitkan dengan waktu pemanasan.

Penelitian ini menggunakan metode teknik pewarnaan dari Phillips & Hayman (1970) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan pada tahap pembersihan isi sel, karena tahap ini merupakan tahap yang sangat penting bagi keberhasilan pewarnaan FMA. Modifikasi yang dilakukan meliputi: konsentrasi KOH, waktu pemanasan, konsentrasi HCl 2% diturunkan menjadi 1%, dan penggunaan cuka komersial 5% sebagai pengganti HCl 1%.

Penambahan HCl (Phillips & Hayman 1970) dan cuka 5% (Vierheilig, 1998) bertujuan agar kondisi asam terjadi. Penggunaan cuka komersial (*vinegar*) lebih ekonomis dan aman dibandingkan dengan HCl yang termasuk asam kuat. Selain itu harga cuka komersial lebih murah dan mudah didapat dibanding dengan HCl. Melalui penelitian ini diharapkan diperoleh metode pewarnaan FMA yang fleksibel dan efektif untuk deteksi dan visualisasi FMA.

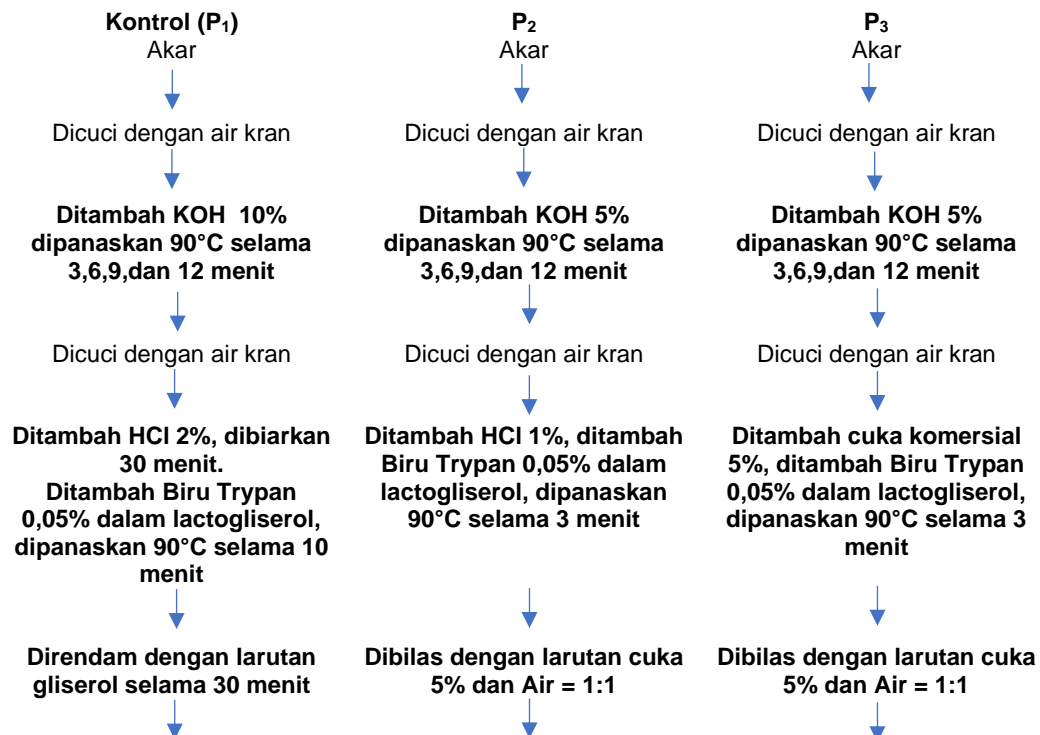
METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2021 di Laboratorium Bioteknologi Hutan, *Biotech Center*, LPPM Institut Pertanian Bogor. Metode yang dipakai pada penelitian ini mengikuti metode Phillips & Hayman (1970) yang dimodifikasi dan dikombinasikan dengan metode Vierheilig (1998) yakni mengganti HCl dengan cuka komersial.

Batang tanaman jagung yang telah dipangkas, diambil akar mulai dari bagian ujung, tengah, dan pangkal. Kemudian dipotong dengan panjang sekitar 5 cm, dicuci dari partikel tanah dan kotoran yang menempel di permukaan dengan air kran sampai bersih. Selanjutnya ditempatkan pada tabung reaksi untuk masing-masing dilakukan pewarnaan dengan diberi perlakuan. Setiap perlakuan terdiri dari minimal 10 potong akar.

Pewarnaan FMA dilakukan dengan dua perlakuan, yaitu 1) waktu pembersihan isi sel, terdiri atas empat faktor yaitu 3, 6, 9, dan 12 menit; dan 2) jenis larutan asam yang digunakan, terdiri atas 2 faktor yaitu HCl 1% dan cuka komersial 5%. Kontrol dalam penelitian ini menggunakan akar yang diwarnai menurut metode Phillips & Hayman (1970) yang dimodifikasi. Proses pembersihan akar menggunakan KOH 10% dipanaskan pada suhu 90°C dengan waktu pembersihan 3, 6, 9, dan 12 menit. Selanjutnya dicuci dengan air kran beberapa kali, dan direndam dalam larutan HCl 2% selama 30 menit. Tahap berikutnya diberi pewarna biru trypan dan dipanaskan pada suhu 90°C selama 10 menit. Terakhir akar direndam dalam larutan gliserol 50% selama 30 menit.

Pada perlakuan, tabung reaksi yang telah berisi potongan akar dituangi larutan KOH 5% kemudian dipanaskan pada suhu 90°C selama 3, 6, 9 dan 12 menit. Dilanjutkan dengan pencucian akar menggunakan air kran beberapa kali, kemudian diberi larutan asam (perlakuan P₂ dengan HCl 1% dan perlakuan P₃ dengan cuka komersial 5%). Selanjutnya diberi pewarna biru trypan 0.05% dalam lactogliserol (asam laktat : gliserol : aquades dengan perbandingan 2:2:1) dipanaskan selama 3 menit pada suhu 90°C. Tahap akhir adalah membuang zat warna pada akar, dengan cara akar dibilas dengan campuran cuka 5% dan air dengan perbandingan 1:1 baik untuk sampel yang menggunakan cuka komersial (P₃) maupun sampel yang menggunakan HCl (P₂). Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali ulangan. Berikut disajikan prosedur pewarnaan akar FMA pada 3 perlakuan (kontrol/P₁, P₂, dan P₃).



Dibuat preparat, dan diamati
dengan mikroskop

Dibuat preparat, dan diamati
dengan mikroskop

Dibuat preparat, dan diamati
dengan mikroskop

Gambar 1. Prosedur pewarnaan akar FMA pada kontrol/P₁, P₂, dan P₃

Akar yang telah diwarnai, baik kontrol maupun perlakuan kemudian dibuat preparat untuk diamati di bawah mikroskop cahaya. Setiap perlakuan dibuat preparat yang berisi 10 potong akar dengan panjang sekitar 1cm. Pengamatan terhadap akar meliputi tekstur akar (belum lunak, cukup lunak, lunak), kebersihan isi sel akar atas sisa sitoplasma (belum bersih, cukup bersih, bersih), dan kekontrasan warna (tidak kontras, cukup kontras, kontras). Tekstur akar diamati saat preparat akar dibuat, sedangkan kebersihan isi sel akar dan kekontrasan warna diamati dengan mikroskop. Kolonisasi FMA diamati di bawah mikroskop dari keberadaan struktur internal yakni hifa, vesikula, arbuskula atau spora dan tidak dipengaruhi oleh pengelompokan berdasarkan kebersihan dari sisa protoplasma. Pengukuran kolonisasi FMA berdasarkan pada total bidang pandang yang bermikoriza dibagi dengan total bidang pandang yang diamati.

$$\text{Kolonisasi FMA} = \frac{\text{Total bidang pandang bermikoriza}}{\text{Total bidang pandang yang diamati}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini visualisasi FMA di dalam akar dilakukan melalui pengamatan dengan mikroskop cahaya. Hasil pengamatan terhadap semua sampel menunjukkan hasil yang baik dalam hal pelunakan akar, sedangkan untuk intensitas pembersihan isi sel dan kekontrasan warna menunjukkan hasil yang berbeda, baik pada P₁, P₂, maupun P₃ (Tabel 1).

Tabel 1. Penampakan isi sel akar jagung (*Zea mays*, L) berumur 10 minggu

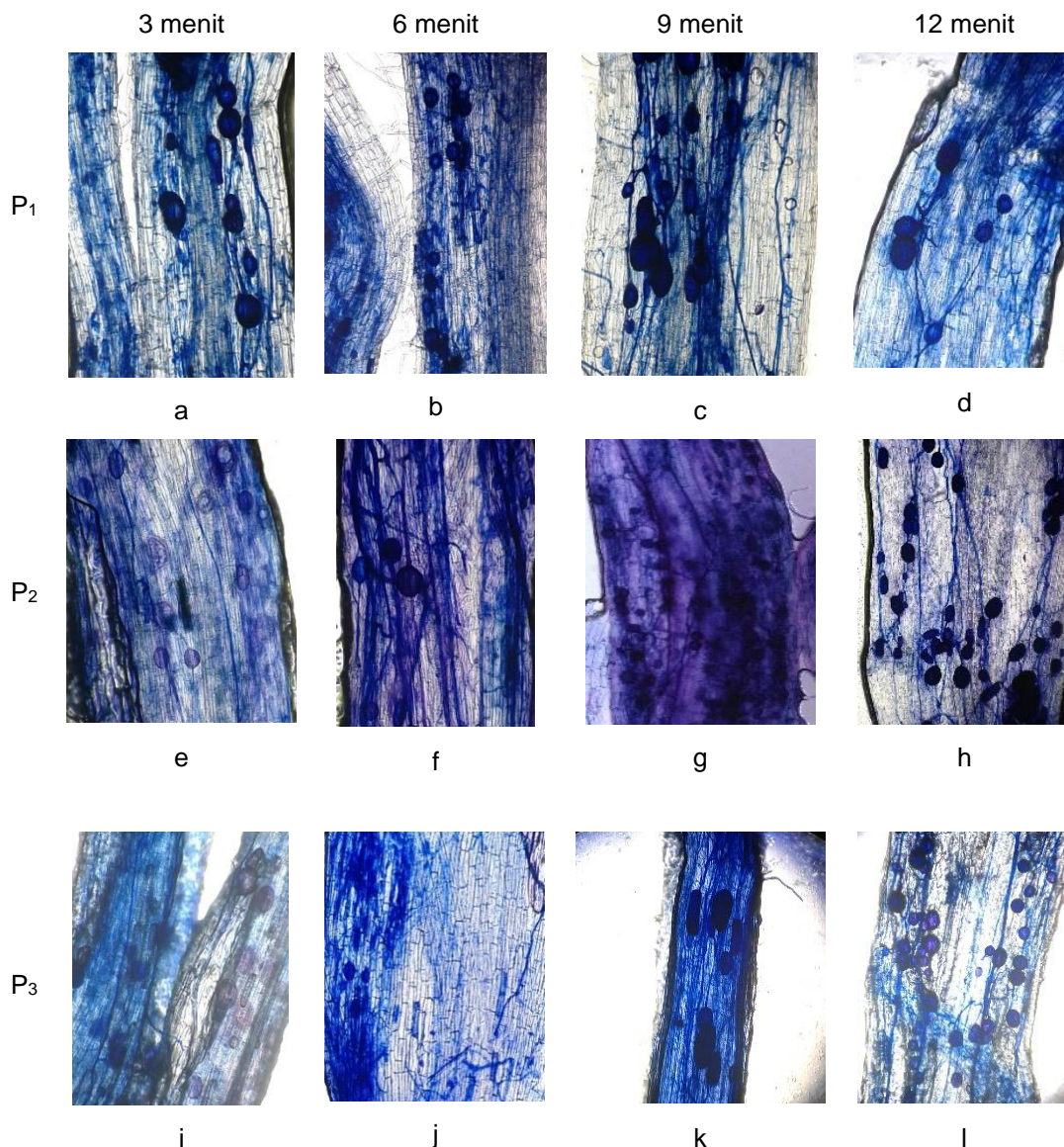
| | Waktu pembersihan isi sel akar | | | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|
| | 3 menit | | | 6 menit | | | 9 menit | | | 12 menit | | |
| | Isi sel | Teks- tur | Kon- tras | Isi sel | Teks- tur | Kon- tras | Isi sel | Teks- tur | Kon- tras | Isi sel | Teks- tur | Kon- tras |
| P ₁ | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| P ₂ | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| P ₃ | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 3 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Keterangan: Isi sel → 1: belum bersih; 2: cukup bersih; 3: bersih
 Tekstur → 1: cukup lunak; 2: lunak; 3: sangat lunak
 Kontras → 1: tidak kontras; 2: cukup kontras; 3: kontras
 P₁ (kontrol) → KOH 10% (dengan HCl 2%)
 P₂ (Perlakuan 1) → KOH 5% (dengan HCl 1%)
 P₃ (Perlakuan 2) → KOH 5% (dengan cuka komersial 5%)

Tabel 1, perlakuan kontrol memberikan hasil yang baik dari segi kebersihan isi, tekstur akar, dan kekontrasan warna baik pada pemanasan 3 menit, 6 menit, maupun 9 menit, sehingga struktur FMA dapat dengan mudah dikenali dan diamati. Kerusakan sel akar terlihat pada pemanasan 12 menit, banyak sel-sel akar yang sudah rusak, sehingga mengganggu visualisasi struktur FMA, walaupun demikian akar terlihat sangat bersih dan penyerapan warna oleh struktur FMA sangat kontras. Isi sel akar memerlukan waktu proses yang berbeda sampai menjadi bersih. Phillips & Hayman (1970) melaporkan bahwa untuk akar yang tidak berpigmen (akar tomat) diperlukan waktu 60 menit, sedang

akar yang berpigmen (kacang) memerlukan waktu 120 menit pada suhu 90°C. Pada akar *Peuraria javanica* yang tidak berpigmen dengan pemanasan selama 20 menit dalam larutan KOH 10% sudah cukup membersihkan isi sel akar (Sulfiah, 2012).

Lamanya waktu pemanasan mempengaruhi kondisi akar baik secara morfologi maupun anatomi. Pemanasan selama 3 menit, menghasilkan akar yang utuh, cukup lunak dan tidak rusak, isi sel akar belum bersih masih terlihat sisa sitoplasma yang keruh (Gambar 2a-c). Penambahan waktu pemanasan menghasilkan akar yang lebih lunak dan penampakan isi sel yang semakin bersih (Gambar 2d-i). Waktu pembersihan 12 menit menunjukkan isi sel yang terlihat bersih namun kerusakan sel-sel akar juga terjadi, akar nampak tidak utuh (Gambar 2j-l). Sel akar yang telah bersih dari isi sel menjadi faktor penting bagi keberhasilan proses pewarnaan. Wilkes, dkk (2020) menyatakan bahwa target pewarnaan adalah hifa, vesikula, dan arbuskula yang berada di dalam korteks akar, sehingga isi sel perlu bersih agar struktur FMA yang berada di dalam korteks tersebut dapat terwarnai dengan baik dan dapat diamati dengan mikroskop cahaya.

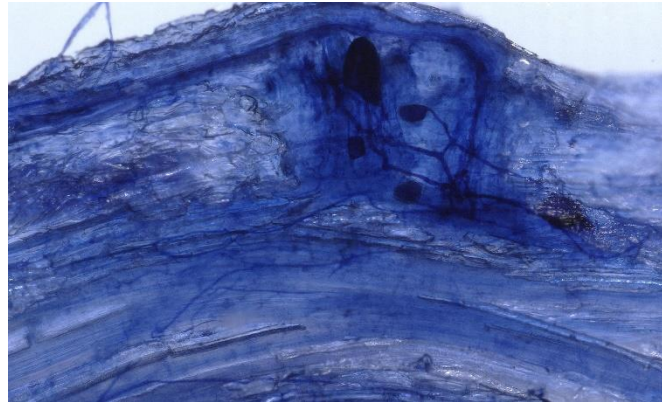


Gambar 2. Struktur hifa dan vesikula pada akar jagung (*Zea mays* L.) berumur 10 minggu pada proses pembersihan isi sel akar 3 menit (a, e, i), 6 menit (b, f, j), 9 menit (c, g, k), dan 12 menit (d, h, l), mikroskop cahaya 100x.

Pemberian larutan asam, HCl atau cuka komersial, dilakukan setelah proses pembersihan isi sel. Penambahan larutan asam ini dilakukan agar akar berada dalam kondisi asam. Dinding hifa FMA

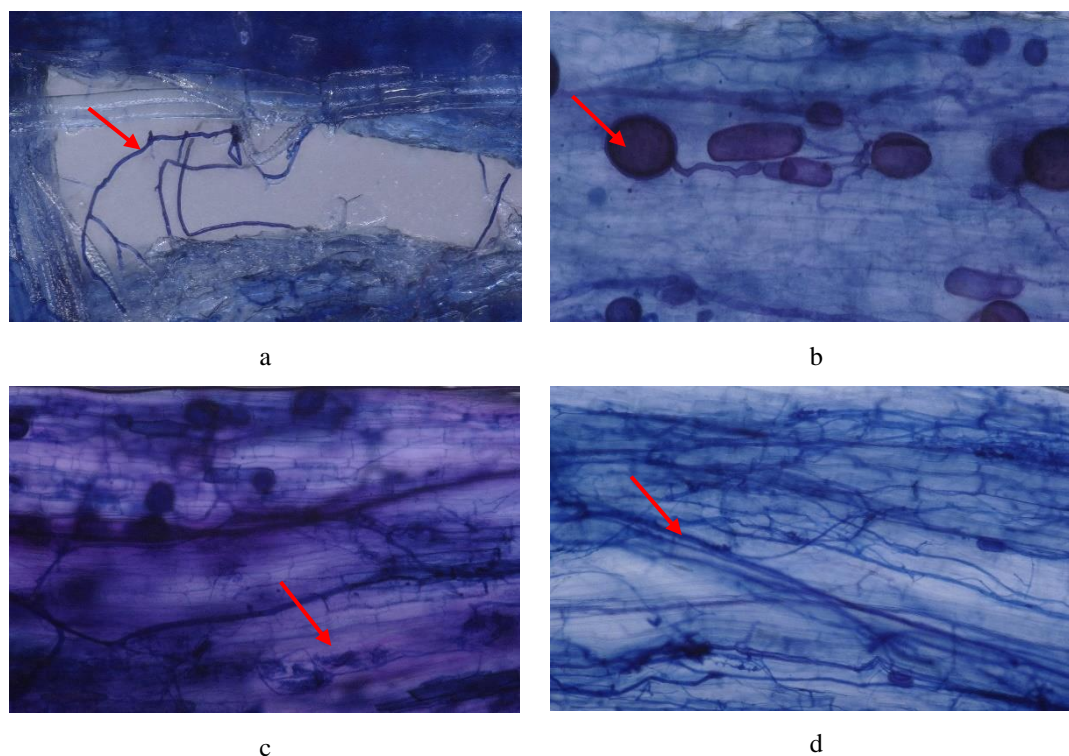
sebagian besar terdiri dari kitin akan mengikat zat warna pada kondisi asam, sehingga struktur FMA dalam akar dapat menyerap warna dengan baik dan pengamatan dapat dengan mudah dilakukan. Perlakuan yang ditambahkan HCl 1% (P₂) dengan cuka komersial 5% (P₃) menunjukkan hasil berbeda (Gambar 2e-g dan i-k) dilihat dari penyerapan dan pemerataan pewarna biru tripan. Perlakuan P₃ yang menggunakan cuka komersial pada beberapa akar menunjukkan pewarnaan tidak merata pada semua bagian akar, masih ditemukan bagian akar dan struktur FMA yang berwarna coklat. Perlakuan dengan menggunakan HCl 1% memperlihatkan pewarnaan yang cukup merata untuk semua bagian akar dan struktur FMA. Walaupun demikian secara keseluruhan baik yang menggunakan HCl maupun cuka, struktur internal FMA dapat dilihat cukup jelas.

Hasil penelitian juga memperlihatkan bahwa perlakuan kontrol P₁ dengan waktu pemanasan 3 dan 6 menit menghasilkan visualisasi akar lebih baik dibanding perlakuan P₂ dan P₃. Sedangkan untuk pemanasan selama 9 dan 12 menit baik P₁, P₂, dan P₃ memberikan hasil yang tidak berbeda dalam hal kebersihan isi sel dan kekontrasan warna. Perbedaan terletak pada tekstur akar yang dihasilkan, untuk pemanasan selama 12 menit tekstur akar sangat lunak sehingga akar sangat rapuh saat dibuat preparat dan sel akar banyak mengalami kerusakan saat diamati di bawah mikroskop, seperti terlihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Sel akar pada pemanasan 12 menit terlihat rusak

Keberadaan struktur FMA berupa hifa eksternal, hifa internal, spora, arbuskula, dan vesikula. Semua struktur tersebut, kecuali spora, ditemukan pada semua perlakuan (Gambar 4a-d).



Gambar 4. Struktur Fungi Mikoriza Arbuskula yang ditemukan dalam akar jagung (*Zea mays* L.) berumur 10 minggu: hifa eksternal (a), vesikula (b), arbuskula (c), hifa internal (d), mikroskop cahaya 400x.

Perlakuan pemanasan 3 menit dengan menggunakan cuka maupun HCl, beberapa vesikula masih berwarna coklat kemerahan, seiring dengan waktu pemanasan yang makin lama, pewarnaan pada struktur FMA makin terlihat biru dan kontras. Semua perlakuan memperlihatkan hifa internal yang terwarnai dengan baik dan kontras. Struktur arbuskula dapat dilihat jelas pada perlakuan pemanasan 9 dan 12 menit, hal ini karena isi sel yang sudah bersih sehingga struktur arbuskula mudah dilihat. Pada perlakuan kontrol P₁, penggunaan KOH 10% dengan pemanasan 3, 6, 9, dan 12 menit menunjukkan isi sel yang semakin bersih dan warna yang semakin kontras serta akar yang semakin lunak. Menurut Cottet (2018), kebersihan isi sel dan kekontrasan warna menguntungkan bagi deteksi dan visualisasi FMA, tetapi dengan tekstur akar yang sangat lunak dari hasil pemanasan selama 12 menit tidak menguntungkan untuk visualisasi FMA karena sel akar rusak dan penampakan FMA dalam struktur akar tidak bagus.

Penggunaan KOH 5% dan 10% untuk membersihkan akar tidak menunjukkan perbedaan dalam hal kolonisasi FMA. Perbedaan konsentrasi KOH sangat berpengaruh pada tekstur akar dan pembersihan isi sel akar. Perlakuan KOH 10% dan pemanasan 12 menit menghasilkan akar yang sangat lunak dan rapuh serta sel-sel akar yang terlihat rusak. Kombinasi konsentrasi larutan KOH dengan waktu pemanasan sangat besar pengaruhnya terhadap pembersihan isi sel, semakin lama waktu pemanasan akar makin bersih, tetapi juga menyebabkan akar makin lunak dan rapuh. Begitu pula dengan meningkatnya konsentrasi KOH akar semakin bersih, sisa sitoplasma yang tertinggal makin berkurang. Hal ini seperti yang dilaporkan Cottet (2018) bahwa bila konsentrasi KOH ditingkatkan dan suhu pemanasan juga ditingkatkan, maka waktu yang diperlukan untuk pemanasan harus dikurangi untuk menghindari kerusakan akar. Jika akar rusak visualisasi FMA tidak dapat dilakukan.

Pada penelitian ini, larutan FAA sebagai larutan awal untuk membersihkan akar tidak digunakan. Demikian pula dengan larutan H₂O₂ yang biasa digunakan untuk akar yang berpigmen dan lignin yang tinggi tidak dipakai. Akar jagung merupakan akar serabut yang tidak berpigmen dan tidak terlalu keras sehingga penggunaan H₂O₂ tidak diperlukan. Larutan KOH sudah cukup untuk membersihkan isi sel akar.

Secara umum, penggunaan KOH konsentrasi 5% maupun 10% , penggunaan HCl maupun asam cuka komersial memberikan hasil pembersihan isi sel yang cukup baik, kolonisasi FMA dapat dilihat pada semua perlakuan dengan baik walaupun masih terlihat isi sitoplasma. Kebersihan isi sel akar dan kekontrasan warna, kontrol P₁, perlakuan P₂, dan P₃ memberikan hasil yang paling baik pada suhu 9

dan 12 menit. Sedangkan untuk tekstur akar, waktu pemanasan 9 menit menghasilkan akar yang lunak tetapi tidak rusak dan visualisasi yang baik di bawah mikroskop. Kontrol (P_1) pada pemanasan 9 menit memberikan hasil yang bagus, tetapi penggunaan bahan masih menggunakan KOH 10% dan HCl 2% sehingga kurang aman dan mahal. Perlakuan P_2 yang masih menggunakan HCl, sehingga masih kurang aman juga. Dengan demikian perlakuan P_3 dengan pemanasan 9 menit menjadi metode alternatif yang lebih aman dan murah. Pemakaian cuka 5% sebagai pengganti HCl memberikan hasil yang baik. Oleh karena itu penggunaan KOH 5% dan cuka yang menggantikan peran HCl dapat menjadi alternatif untuk deteksi dan visualisasi FMA. Konsentrasi KOH yang berkurang dari 10% menjadi 5% serta substitusi HCl 2% oleh cuka komersial menjadi metode pilihan yang lebih aman dan ekonomis.

Semua perlakuan menggunakan pewarna biru trypan untuk melihat koloni FMA. Pembentukan koloni FMA pada semua perlakuan ditunjukkan pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Kolonisasi Fungi Mikoriza Arbuskula pada akar jagung (*Zea mays* L.) menggunakan biru trypan

| | Kolonisasi FMA (%) | | | |
|-------|--------------------|---------|---------|----------|
| | 3 menit | 6 menit | 9 menit | 12 menit |
| P_1 | 83,34 | 90,48 | 85,19 | 93,58 |
| P_2 | 41,10 | 44,60 | 77,70 | 83,30 |
| P_3 | 71,11 | 43,10 | 77,50 | 92,20 |

Keterangan P_1 : KOH 10% (dengan HCl 2%)
 P_2 : KOH 5% (dengan HCl 1%)
 P_3 : KOH 5% (dengan cuka komersial 5%)

Jika merujuk pada kriteria Rajapakse dan Miller (1992) dalam Nusantara (2011), kolonisasi FMA dikategorikan sebagai berikut: <5% = sangat rendah (kelas 1), 6-25% = rendah (kelas 2), 26-50% = sedang (kelas 3), 51-75% = tinggi (kelas 4), dan >75% = sangat tinggi (kelas 5). Dari data tabel 2, terlihat kolonisasi FMA pada jagung masuk kategori kelas 3 sampai kelas 5. Hal ini menunjukkan bahwa akar jagung dapat menjadi inang yang cocok bagi mikoriza dan terjadi hubungan simbiosis mutualisme. Perlakuan P_1 , P_2 , dan P_3 tidak berpengaruh pada keberadaan struktur FMA dalam akar dan tidak mempengaruhi nilai persentase kolonisasi. Perlakuan P_1 , P_2 , dan P_3 adalah perlakuan yang lebih ditujukan pada pembersihan sel akar dapat terwarnai dengan baik sehingga deteksi dan visualisasi dapat dilakukan dengan mudah. Sehingga bila dikaitkan dengan visualisasi pembentukan koloni FAM maka perlakuan P_3 dengan pemanasan 9 menit menjadi metode alternatif yang lebih aman dan murah. Penggunaan KOH 5% dan cuka yang menggantikan peran HCl dapat menjadi alternatif untuk deteksi dan visualisasi FMA, serta menjadi metode pilihan yang lebih aman dan ekonomis.

KESIMPULAN

Pembersihan isi sel akar merupakan proses awal yang sangat penting untuk mendeteksi dan memvisualisasikan FAM di dalam akar tumbuhan. Kombinasi konsentrasi bahan yang digunakan dan lamanya pemanasan menentukan keberhasilan dalam pembersihan isi sel akar. Konsentrasi KOH 5% sebagai bahan pembersih isi sel dengan waktu pemanasan 9 menit memberikan hasil yang paling baik. Pemakaian cuka 5% sebagai pengganti HCl juga memberikan hasil yang baik dan dapat menjadi alternatif bahan yang dipakai untuk preparasi sampel. Konsentrasi KOH yang berkurang dari 10% menjadi 5% serta substitusi HCl 2% oleh cuka komersial menjadi metode pilihan yang lebih aman dan ekonomis.

DAFTAR PUSTAKA

- Basri, AHH. (2018). Kajian peranan mikoriza dalam bidang pertanian. *Agrica Ekstensia*. 12 (2): 74-78.
- Brundrett, M, Bougher N, Dell B, Grove T, and Majczuk N. (1996). *Working with Mycorrhiza in Forestry and Agriculture*. ACIAR Monograph. Canberra. Australia.
- Cottet, AC., Scervino, JM., Messuti, MI. (2018). Improved staining protocol for assesment of arbuscular mycorrhizal in Bryophytes. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 53 (2).
- Brundrett. MC. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* 154: 275-304.
- Nusantara AD. (2011). Pengembangan produksi inokulan fungi MA berbasis bahan alami dan pemanfaatannya untuk produksi bibit jati (*Tectona grandis* L.f). [Disertasi]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Phillips JM dan Hayman DS. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transsaction of British Mycological Society*. 55: 58-161.
- Smith SE & Read DJ. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd Edition, Academic Press, London.
- Sulfiah, S. (2012). Pembersihan isi sel akar dan jenis warna tinta untuk deteksi cendawan mikoriza arbuskula. [Skripsi]. Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- Vierheilig H, Coughlan AP, Wyss U, Piche Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Environment Microbiology*. 64: 5004-5007.
- Wilkes TI., Warner DJ, Brown VE, Davies KG, Denholm I. (2020). A comparison of methodologies for the staining and quantification of intracellular components of arbuscular mycorrhizal fungi inn the root cortex of two varities of winter wheat. *Access Microbiology*. 2.
- Yon, YR., Perez LA., Carmona AM., Perez YM., Garcia M., Suarez KF, Echevarria AM. (2015). Alternative staining technique to determine mycorrhizal colonization. *Cultivos Tropicales* 36: 18-21.