

**PENAPISAN KAPANGASAL LAHAN SULFAT MASAM KALIMANTAN
SELATAN SEBAGAI PENGHASIL ENZIM EKSTRASELULER**

***SCREENING OF ACID SULPHATE SOILS FUNGI FROM SOUTH KALIMANTAN
AS SOURCE OF EXTRACELULAR ENZYMES***

Dwi N. Susilowati^{1*}, Indah Sofiana², Kristina Dwi Atmini¹, Erny Yuniarti³

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian,
Jl. Tentara Pelajar No. 3A Bogor 16111

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Jakarta, Kampus A, Jl. Rawamangun Muka, Jakarta Timur 13220

³Balai Penelitian Tanah, Jl. Ir. H. Djuanda No. 98, Bogor 16123

*Email: d_nengsusi@yahoo.com

Diterima: 5 Juli 2020, disetujui 1 Oktober 2020

ABSTRACT

*Kalimantan acid sulphate land has the potential to be developed into productive land, with good land optimization. Utilization of rhizosphere microorganism diversity, especially mold can potentially provide a solution in optimizing agricultural land, namely the ability to produce extracellular enzymes. This study aims to determine the potential of mold originating from acid sulphate fields in producing extracellular enzymes (pectinase, chitinase, glucanase, cellulase, and phosphatase). The study was conducted in June-July 2019 at the Microbiology Laboratory, Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development. Screening of extracellular enzyme-producing fungi was carried out on selection media. The results obtained by some isolates have the ability to produce extracellular enzymes. Indications of the ability of mold to produce extracellular enzymes are the presence of clear zones in the selection medium. In pectinase, chitinase and glucanase testing all isolates showed negative results. Potential isolates in producing extracellular enzymes include *Penicillium* sp. Paddy 4.1 (cellulolytic index 2.43), *Clonostachys* sp. KRMT 17.9 and *Penicillium singorense* KLK 13.7 (proteolytic indices 3.97 and 3,00, respectively). The difference in index values indicates the variation in the level of enzyme activity.*

Keywords: acid sulfate field, mold, extracellular enzymes

ABSTRAK

Lahan sulfat masam kalimantan berpotensi untuk dikembangkan menjadi lahan yang produktif, dengan pengoptimalan lahan yang baik. Pemanfaatan keanekaragaman mikroorganisme rhizosfer, khususnya kapang dapat berpotensi memberikan solusi dalam pengoptimalan lahan pertanian, yaitu dengan kemampuan menghasilkan enzim-enzim ekstraseluler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi kapang asal lahan sulfat masam dalam menghasilkan enzim ekstraseluler (pektinase, kitinase, glukonase, selulase, dan fosfatase). Penelitian dilakukan pada bulan Juni-Juli 2019 di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Penapisan kapang penghasil enzim ekstraseluler dilakukan pada media seleksi. Hasil penelitian diperoleh beberapa isolat memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim ekstraseluler. Indikasi adanya kemampuan kapang dalam menghasilkan enzim ekstraseluler yaitu adanya zona bening pada medium seleksi. Pada pengujian pektinase, kitinase dan glukonase semua isolat menunjukkan hasil yang negatif. Isolat yang potensial dalam menghasilkan enzim ekstraseluler diantaranya *Penicillium* sp. Padi 4.1 (indeks selulolitik 2.43), *Clonostachys* sp. KRMT 17.9 dan *Penicillium singaporense* KKK 13.7 (masing-masing indeks proteolitik 3.97 dan 3,00). Perbedaan nilai indeks menunjukkan adanya variasi tingkat aktivitas enzim.

Kata kunci: Lahan sulfat masam, kapang, Enzim Ekstraseluler

PENDAHULUAN

Lahan rawa di Indonesia berpotensi untuk dikembangkan sebagai lahan pertanian yang produktif (Haryono *et al.* 2013). Namun lahan rawa memiliki beberapa kendala dalam hal tingkat kesuburan tanah, diantaranya bersifat sulfat masam, miskin hara, dan mengandung senyawa-senyawa toksik seperti Al, Fe, H₂S (Suastika *et al.* 2006). Lahan sulfat masam di Indonesia mencapai 6,71 juta hektar dan sekitar 1,7 juta hektar terdapat di Kalimantan (Haryono *et al.* 2013).

Lahan rawa merupakan sumber keanekaragaman hayati yang tinggi termasuk mikroba tanah di dalamnya (Mukhlis *et al.* 2010). Mikroba tanah yang berada pada lingkungan rizosfer dapat membantu pengoptimalan penyediaan hara serta pertumbuhan tanaman. Komponen-komponen yang terdapat pada rizosfer seperti tanaman, tanah, mikroorganisme, nematoda dan protozoa secara ekologi berkontribusi terhadap berbagai macam sifat dan interaksi di dalamnya. Selain bakteri, kapang juga merupakan mikroorganisme yang

cukup melimpah pada lingkungan rizosfer (Sumarsih, 2003).

Pemanfaatan keanekaragaman mikroorganisme tanah, khususnya kapang dapat berpotensi memberikan solusi dalam pengoptimalan lahan pertanian, diantaranya sebagai agen pengendali hayati, agen pemacu pertumbuhan, serta peningkatan ketersediaan hara (Hanafiah *et al.* 2005). Pemanfaatan enzim-enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh mikroorganisme sangat berperan penting dalam berbagai fungsi hayati serta dalam berbagai kepentingan pertanian maupun kepentingan industri. Penggunaan mikroorganisme untuk produksi enzim memiliki beberapa kelebihan, diantaranya mudah diproduksi dalam skala besar, waktu produksi relatif pendek serta dapat diproduksi secara berkesinambungan dengan biaya yang relatif rendah (Thomas, 1984). Kapang merupakan sumber mikroorganisme yang berpotensi memiliki kemampuan dalam menghasilkan enzim-enzim ekstraseluler yang perlu dipelajari lebih lanjut sehingga diketahui potensinya dalam pengoptimalan lahan pertanian. Pemanfaatan kapang dalam menghasilkan enzim ekstraseluler

masih belum banyak diketahui, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi kapang asal lahan sulfat masam Kalimantan Selatan sebagai penghasil enzim-enzim ekstraseluler. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi kapang asal lahan sulfat masam dalam menghasilkan enzim ekstraseluler (pektinase, kitinase, glukonase, selulase, dan fosfatase).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-Juli 2019. Sampel isolat kapang asal lahan sulfat masam Kalimantan Selatan merupakan koleksi Biogen Culture Collection (BiogenCC). Peremajaan isolat kapang serta penapisan kapang penghasil enzim ekstraseluler dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB. Biogen) dan Laboratorium Biologi Tanah, Balai Penelitian Tanah, Balai Besar Sumberdaya Lahan Pertanian (BBSDLP).

Penapisan Kapang Asal Tanah Sulfat Masam sebagai Penghasil Enzim Ekstraseluler

Sebanyak 53 koleksi kapang diremajakan terlebih dahulu dengan cara dipindahkan ke media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang baru menggunakan metode *Cork Borer*. Inkubasi dilakukan selama 5-7 hari pada suhu 27°C. Penapisan isolat sebagai penghasil enzim ekstraseluler dilakukan secara duplo dengan pengujian sebagai berikut:

Uji Aktifitas Pektinolitik

Aktivitas pektinolitik diamati berdasarkan pertumbuhan kapang pada medium pektin agar yang terdiri atas pektin (5 g/L), ekstrak kamir (1 g/L), dan agar bakto (20 g/L). Isolat kapang

uji selanjutnya ditransfer ke media pektin agar dan diinkubasi pada suhu 25° C selama 3-7 hari. Setelah itu, koloni kapang uji pada media pektin agar dituangi dengan larutan 1% *hexadecyl trimethyl ammonium bromide*. Zona bening akan terbentuk di sekitar koloni kapang yang mengindikasikan kapang tersebut mampu menghasilkan pectinase. Aktivitas kapang dalam mendegradasi pektin dinyatakan dengan indeks pektinolitik.

Uji Aktifitas Kitinolitik

Aktivitas kitinolitik diamati berdasarkan pertumbuhan kapang uji pada medium kitin agar yang terdiri atas $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), NaCl (1 g/L), $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ (1 g/L), ekstrak kamir (7 g/L), tripton (1 g/L), koloidal kitin (15 ml/L), dan agar bakto 20 g/L. Isolat kapang uji ditumbuhkan pada media kitin agar dan diinkubasi pada suhu 25° C selama 3-7 hari. Selanjutnya koloni kapang uji pada media kitin dituangi dengan larutan 0,3% *congo red* dan dibilas dengan 1 N NaCl. Zona bening akan terbentuk disekitar koloni fungi yang mengindikasikan aktivitas kitinolitik. Aktivitas kapang dalam mendegradasi kitin dinyatakan dengan indeks kitinolitik.

Uji Aktifitas Glukanolitik

Aktivitas glukanolitik diamati berdasarkan pertumbuhan kapang uji pada medium glukon padat. Sebelum membuat media glukon padat, dipersiapkan terlebih dahulu pelet glukon dengan cara tepung oat sebanyak 10 g dilarutkan ke dalam 100 mL akuades, kemudian pH diatur menjadi 10 dengan Na_2CO_3 20% sambil diaduk dengan magnetik stirer. Selanjutnya dilakukan pemanasan pada suhu 45 °C selama 30 menit sambil terus diaduk, lalu disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 5000 rpm

pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan pH disesuaikan menjadi 4,5 dengan menambahkan HCl 1 N sedikit demi sedikit. Kemudian disentrifuge kembali selama 20 menit pada kecepatan 5000 rpm. Supernatan diambil dan ditambahkan dengan etanol 95% secara perlahan sambil diaduk dengan magnetic stirer dan disentrifuge kembali selama 10 menit pada suhu 4°C dengan kecepatan 500 rpm. Setelah selesai endapan diambil dan ditambahkan 15-20 mL *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dan diaduk hingga larut, kemudian disimpan selama semalam pada suhu 4°C dan pelet glukosa siap dipergunakan. Pembuatan media glukosa padat dibutuhkan bahan-bahan sebagai berikut, pelet glukosa (1mL), Na₂HPO₄ (0,065 g/L), KH₂PO₄ (0,15 g/L), NaCl (0,25 g/L), (NH₄)₂SO₄ (0,05 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,012 g/L), CaCl₂ (0,005 g/L), pepton (0,125 g/L), ekstrak kamir (0,05 g/L), dan agar bakto (20 g/L). Kultur ditumbuhkan pada media glukosa padat dan inkubasi pada suhu 25° C, selama 3-7 hari kemudian cawan petri uji dituang dengan larutan 0,2% congo red dan dibilas dengan larutan 1 M NaCl selama 15-20 menit. Zona bening akan terbentuk di sekitar koloni fungi yang mengindikasikan aktivitas glukanolitik. Aktivitas kapang dalam mendegradasi glukosa dinyatakan dengan indeks glukanolitik.

Uji Aktifitas Selulolitik

Aktivitas enzim selulolitik diamati dengan melihat pertumbuhan kapang uji pada media selektif CMC agar. Komposisi media CMC agar terdiri atas CMC (1g/L), MgSO₄·7H₂O (0,02 g/L), KNO₃ (0,075 g/L), K₂HPO₄ (0,05 g/L), FeSO₄·7H₂O (0,002 g/L), CaCl₂·2H₂O (0,004 g/L), ekstrak kamir (0,2 g/L), glukosa (1 g/L), dan agar bakto (20 g/L). Kultur ditumbuhkan pada medium CMC agar dan

diinkubasi pada suhu 25° C selama 5-7 hari. Selanjutnya setelah ada pertumbuhan kapang uji, dilakukan , penuangan larutan 0,3% *congo red* pada permukaan koloni dan dibilas dengan 1 M NaCl selama 15-20 menit. Zona bening akan terbentuk di sekitar koloni kapang uji yang mengindikasikan aktivitas selulolitik. Aktivitas kapang dalam mendegradasi selulosa dinyatakan dengan indeks selulolitik.

Uji Aktifitas Fosfolitik

Isolat kapang endofit hasil peremajaan diseleksi dengan medium selektif *Pikovskaya's agar*. Komposisi media *Pikovskaya's agar* terdiri atas glukosa (10 g/L), Ca₅(PO₄)₃OH (5 g/L), NaCl (0,2 g/L), KCl (0,2 g/L), MgSO₄·7H₂O (0,1 g/L), MnSO₄·H₂O (0,0025 g/L), FeSO₄·7H₂O (0,0025 g/L), ekstrak kamir (0,5 g/L), (NH₄)₂SO₄ (0,5 g/L), dan agar bakto (20 g/L). Isolat kapang diinokulasikan ke medium selektif *Pikovskaya's Agar* dan diinkubasi selama 5-7 hari di pada suhu 25° C (Akbar, 2014). Zona bening akan terbentuk di sekitar koloni kapang yang mengindikasikan aktivitas fosfolitik. Aktivitas kapang dalam mendegradasi fosfat dinyatakan dengan indeks fosfolitik.

Indeks Aktivitas Enzim Ekstraseluler

Indeks aktivitas enzim ekstraseluler (pektinolitik, kitinolitik, glukanolitik, selulolitik, dan fosfolitik) dilakukan terhadap terbentuknya zona hidrolisis. Indeks aktivitas enzim diperoleh dengan membandingkan diameter zona hidrolisis dengan diameter koloni jamur pada media uji.

Pengamatan Morfologi

Isolat kapang diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis berupa pengukuran diameter koloni, bentuk koloni, warna permukaan koloni (*above and reverse*),

tepi koloni, densitas koloni, elevasi, tekstur permukaan, dan tipe miselium koloni kapang (Barnett & Hunter, 1998). Pengamatan mikroskopis dengan mengambil miselia kapang kemudian diamati dibawah mikroskop cahaya perbesaran 40x.

Identifikasi secara Molekuler

Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *Kit Phytopure™ (Amersham)* dengan prosedur sesuai dengan protokol kit tersebut. Isolasi DNA diawali dengan pelisisan dinding sel, miselia digerus hingga lembut di dalam plastik steril. Kemudian ditambahkan 600 μ L Reagen 1 dan dihomogenkan. Kemudian ditambahkan sebanyak 200 μ L Reagen 2 dan dibolak balik hingga homogen, selanjutnya diinkubasi pada *water bath shaker* 65°C selama 10 menit, kemudian diinkubasi pada *freezer* selama 20 menit.

Setelah 20 menit dikeluarkan dari *freezer* dan ditambahkan 500 μ L kloroform dingin (-20°), kemudian ditambahkan 100 μ L *Nucleon Phytopure DNA extraction resin suspension*, dihomogenkan di *shaker* selama 10 menit pada suhu ruang. Kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 1300 g. Fasa DNA di atas *brown resin layer* dipindahkan menggunakan pipet ke dalam *tube* baru. Kemudian ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan supernatan (fasa DNA), *tube* dibolak balik hingga DNA terpresipitasi. Kemudian disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 4000 g, pelet DNA dicuci dengan etanol 70% dingin. Kemudian disentrifuge kembali, supernatan dibuang dan pelet DNA dikeringkan selama 10 menit dan sisa etanol dihilangkan dari tabung. DNA diresuspensi dalam 50 μ L *buffer TE* atau *nuclease free water*.

Nilai konsentrasi dan kemurniaan DNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer nanodrop (Thermo) yang terhubung dengan software nanodrop 2000 pada komputer. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan menggunakan fitur *Nucleic Acid* pada *software*, kemudian ukuran panjang gelombang diverifikasi. Sebanyak 2 μ L larutan blanko diteteskan ke dalam nanodrop lalu dipilih *blank* atau F3, selanjutnya diteteskan 2 μ L DNA *solution* pada nanodrop, kemudian dipilih *measure* atau F1 untuk mulai mengukur kemurnian dan konsentrasi DNA. Masing-masing isolat yang diukur diberi kode untuk memudahkan pendataan dan hasil pengukuran bisa langsung dibaca.

Amplifikasi dan Visualisasi DNA

DNA diamplifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer ITS4 (reverse) (5'-TCCGTAGGTGA ACCTGCGC-3') (White et al. 1990). secara parsial. DNA diamplifikasikan dengan menggunakan 25 μ L PCR mix yang terdiri dari 8.5 μ L *nuclease free water*, 12.5 μ L *Go taq green master mix*, 1 μ L primer ITS 4, dan 2 μ L DNA *template*.

Hasil amplifikasi DNA dimigrasikan menggunakan elektroforesis gel agarose. Sebanyak 3 μ L produk PCR dimigrasikan di dalam gel agarose yang sudah ditambahkan 1% *gel red*. Gel agarose direndam dalam 1 x buffer TAE dan diberikan tegangan 110 volt selama 30 menit. DNA divisualisasikan menggunakan sinar UV di dalam *Gel DocXR*.

Sekuensing DNA

Proses pembacaan urutan nukleotida DNA isolat kapang endofit dilaksanakan dengan mengirim sampel ke *Ist BASE*. Apabila sampel

telah selesai dibaca urutan nukleotida, file dapat diunduh dalam bentuk *file* dengan *extention*. ABI dan Seq.

Analisis Data Bioinformatika dan Kekekabatan

DNA isolat kapang endofit yang telah ditentukan urutan nukleotidanya diolah dengan software MEGA X untuk diidentifikasi sampai tingkat taksa spesies menggunakan metode bioinformatika *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* secara online dengan pencocokan sekuen DNA kapang yang tersedia pada database *Nukleotida National Center for Biotechnology Information* atau NCBI. Analisis kekerabatan setiap sampel isolat kapang endofit digambarkan dengan konstruksi pohon filogenetik yang dibuat juga menggunakan MEGA X. Metode konstruksi menggunakan *Neighbour Joining Tree* dengan *Bootstrap* 1000 replikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Enzim

Uji aktivitas enzim ekstraseluler dari isolate kapang lahan sulfat masam asal Kalimantan Selatan dilakukan untuk mengetahui potensi kapang tersebut sebagai penghasil enzim ekstraseluler seperti pektinase, kitinase, glukonase, selulase, dan fosfatase. Menurut Herdyastuti *et al.* (2009) aktivitas enzim ekstraseluler secara kualitatif dapat diuji dengan penentuan adanya zona bening di sekitar pertumbuhan koloni pada medium uji. Potensi isolat yang menghasilkan enzim ekstraseluler ditentukan berdasarkan perbandingan zona bening terhadap ukuran koloni yang dinyatakan dalam indeks aktivitas enzim.

Berdasarkan hasil pengamatan pada 9 isolat kapang uji, uji pektinolitik, kitinolitik, dan

glukanolitik menunjukkan hasil yang negatif pada seluruh isolat (Tabel 1). Hal tersebut dapat terlihat dari tidak adanya zona bening yang terbentuk pada medium agar selektif, sehingga mengindikasikan bahwa isolat tersebut tidak mampu mendegradasi senyawa pektin, kitin, maupun glukon yang terkandung di dalam medium.

Tidak terbentuknya kitinase juga dapat diakibatkan oleh ketidaksesuaian jenis kitin terhadap isolat uji. Menurut Nasarna *et al.* (2013), beragamnya kemampuan mikroba menghasilkan berbagai jenis kitinase dan pendegradasi kitin lainnya merupakan upaya penyesuaian terhadap keberagaman jenis, tipe, dan struktur kitin yang tersedia. Widyastuti *et al.* (2012) menegaskan komposisi medium berpengaruh terhadap pertumbuhan sel dan produksi enzim. Sintesa kitinase dipengaruhi oleh sumber karbon dan konsentrasinya di dalam medium.

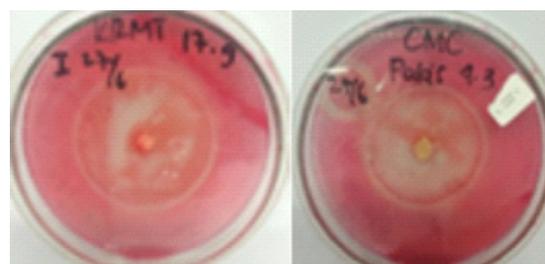
Jumlah senyawa uji sebagai substrat yang terkandung di dalam medium juga dapat mengakibatkan tidak terpicunya isolat kapang dalam menghasilkan enzim sehingga zona bening tidak terbentuk. Sumarlin *et al.* (2013), menyatakan jumlah substrat pada lingkungan sangat penting dalam memicu mikroba untuk mengeluarkan enzim.

Uji selulolitik menunjukkan keseluruhan isolat memiliki kemampuan dalam menghidrolisis selulosa, dan terdapat satu isolat yang memiliki indeks selulolitik tertinggi yaitu isolat Padi 4.1 sebesar 2,43. Selulase termasuk kelompok enzim yang mampu mendegradasi selulosa menjadi fraksi yang lebih kecil. Menurut Munifah (2011), selulase menghidrolisis selulosa dengan memutus ikatan glikosidik β -1,4 dalam selulosa, selodektrin, selobiosa, dan turunan

selulosa lainnya menjadi gula sederhana atau glukosa. Pertumbuhan dan kemampuan mikroorganisme selulolitik dalam merombak selulosa ditandai dengan terbentuknya zona bening pada medium CMC. Zona bening yang timbul menunjukkan terjadinya hidrolisis bahan organik dalam substrat yang diakibatkan oleh enzim selulase dari mikroba. Isolat-isolat yang mampu menghasilkan selulosa sangat diperlukan untuk bahan aktif formula pendegradasi bahan organik. Menurut Mukhlis (2014), bahan organik memerlukan proses dekomposisi atau proses pengomposan memerlukan waktu yang relatif lama tergantung metode penanganan dan komposisi kimia bahan organik (terdapat senyawa-senyawa yang sulit terdekomposisi seperti selulosa dan lignin yang tinggi).

Menurut Anand *et al.*, (2009) *Congo red* akan berikatan secara spesifik dengan polisakarida yang memiliki ikatan β -1,4 glikosida. Warna merah menunjukkan sisa selulosa yang tidak terhidrolisis sehingga terjadi pembentukan selulosa *Congo red*. Zona bening yang terbentuk dapat dilihat dengan jelas melalui pencucian menggunakan NaCl 1 M. *Congo red* merupakan garam natrium dari $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$ sehingga pewarna ini akan larut dan tercuci oleh garam natrium lain, seperti NaCl.

Berdasarkan Tabel 1 diperoleh perbedaan indeks aktivitas selulolitik yang dilihat berdasarkan indeks kelarutan masing-masing isolat kapang endofit. Hal ini diduga karena selulase diekskresikan oleh masing-masing isolat kapang endofit yang berbeda potensinya untuk menguraikan substrat dalam media pertumbuhan.



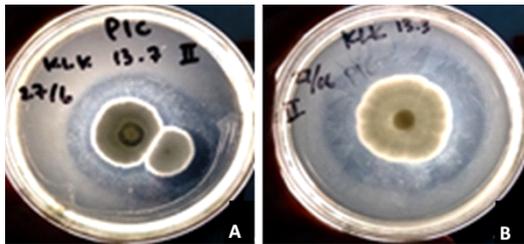
Gambar 1 Zona Bening yang Dihasilkan oleh Isolat Kapang Endofit pada Medium CMC agar (A) KRMT 17.9, dan (B) Pakis 4.3

Uji fosfolitik menunjukkan sebanyak 7 isolat mampu menghidrolisis fosfat, dan terdapat 2 isolat yang memiliki indeks fosfolitik tertinggi yaitu isolat KRMT 17.9 (3,97), dan KLK 13.7 (3,00). Zona bening menunjukkan bahwa koloni kapang endofit mampu melarutkan fosfat yang terikat di medium dan luas zona bening menunjukkan secara kualitatif besarnya kemampuan dalam melarutkan fosfat. Zona bening pada medium padat seperti *Picovskaya's*

Tabel 1 Hasil Pengamatan Indeks Aktifitas Kapang Dalam Menghidrolisis Enzim Ekstraseluler

No	Kode Isolat	Indeks (mm)				
		Pektinolitik	Kitinolitik	Glukanolitik	Selulolitik	Fosfolitik
1.	Pakis 4.3	-	-	-	2,20	2,52
2.	KRMT 17.9	-	-	-	2,06	3,97
3.	Padi 5.2	-	-	-	2,04	2,94
4.	KLK 13.7	-	-	-	-	3,00
5.	Bth	-	-	-	1,83	-
6.	KLK 13.3 Karamunting	-	-	-	2,08	2,65
7.	14.11	-	-	-	2,06	2,60
8.	KRMT 2.7	-	-	-	-	-
9.	Padi 4.1	-	-	-	2,43	2,39

Agar tidak dapat menunjukkan banyak sedikitnya jumlah P terlarut yang dapat disumbangkan oleh setiap kapang endofit, meskipun luas sempitnya daerah bening dapat menunjukkan besar kecilnya kapang endofit melarutkan fosfat (Marista *et al.*, 2013).



Gambar 2 Zona Bening yang Dihasilkan oleh Isolat Kapang Endofit pada Medium *Picovskaya's Agar* dengan Ca (A) KLK 13.7, dan (B) KLK 13.3

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat kapang endofit mampu melarutkan fosfat di medium *Picovskaya's Agar* dari sumber $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ dengan adanya zona bening yang terbentuk, tetapi pada medium dengan sumber AlPO_4 dan FePO_4 tidak terdapat zona bening yang terbentuk sama sekali. Fosfat yang diikat Ca lebih mudah larut dibandingkan yang lain, karena Ca mengikat fosfat paling lemah dibandingkan Fe dan Al yang mengikat fosfat lebih kuat (Raharjo *et al.*, 2007).

Hal ini yang menyebabkan zona bening terbentuk di medium yang mengikat fosfat menggunakan Ca. Sedangkan pada medium dengan sumber fosfat Fe dan Al kemungkinan besar bahwa asam organik yang dihasilkan dalam waktu inkubasi satu minggu belum cukup kuat dan banyak untuk melarutkan fosfat di medium., Menurut Elfiati *et al.* (2016), kemudahan fosfat terlepas mengikuti urutan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{AlPO}_4 > \text{FePO}_4$.

Semakin besar nilai indeks pelarutan fosfat, maka semakin besar pula kemampuan isolat kapang tersebut dalam melarutkan fosfat.

Menurut Ulfiyati dan Enny (2015), indeks pelarutan fosfat merupakan rasio antara diameter zona bening yang dihasilkan oleh isolat kapang endofit. Isolat kapang endofit menghasilkan indeks pelarutan fosfat yang berbeda-beda jumlahnya antara satu sama lain. Variasi indeks pelarutan fosfat ini berkaitan dengan asam organik yang dihasilkan oleh setiap isolat kapang endofit berbeda dan kekuatan setiap asam organik dalam melarutkan fosfatnya juga tidak sama. Menurut Elfiati *et al.* (2016), urutan asam organik dari kemampuannya melarutkan fosfat dari tinggi ke rendah adalah: asam sitrat > asam oksalat = asam tartrat = asam malat > asam laktat = asam format = asam asetat. Asam organik yang membentuk kompleks yang lebih kuat dengan kation logam akan lebih efektif dalam melepas Ca, Al dan Fe sehingga akan melepas P yang lebih besar.

Morfologi

Identifikasi morfologi sangat penting dilakukan sebagai dasar pengamatan untuk melakukan identifikasi kapang yang belum diketahui namanya. Hal ini juga ditegaskan oleh Jumiyati *et al.* (2012), yang menyatakan bahwa pengamatan morfologi merupakan dasar utama yang dapat digunakan untuk melakukan identifikasi dan klasifikasi suatu kapang yang belum diketahui namanya.

Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan mengamati bentuk (*shape*), warna (*colour*) pada bagian atas (*above*) dan sebaliknya (*reverse*), tekstur (*texture*), tipe misellium (*mycellium type*), elevasi (*elevation*), (*edge*), kerapatan (*density*), dan besar koloni setelah tujuh hari (*size after seven days*). Karakteristik morfologi kapang asal tanah sulfat masam Kalimantan Selatan ditunjukkan Tabel 2.

Tabel 2 Karakteristik Morfologi Isolat Kapang asal Tanah Sulfat Masam Kalimantan Selatan

No	Kode isolat	Bentuk	Warna		Elevasi	Tekstur	Miselium	Tepian	Densitas	Diameter 7hsi
			Atas	Bawah						
1.	Pakis 4.3	Sirkular	Chocolate	Dark chocolate	Flat	Granular	Immerse	Dentate	Dense	3,1
2.	KRMT 17.9	Sirkular	White	Cream to yellow	Raised	Cottony	Aerial	Filamentus	Medium	3,3
3.	Padi 5.2	Sirkular	Cream to yellow	Cream to yellow	Flat	Cottony	Aerial	Filamentus	Medium	3
4.	KLK 13.7	Sirkular	White	White	Raised	Cottony	Aerial	Filamentus	Dense	3,2
5.	Bth	Sirkular	Grey to black	Grey	Flat	Fluffy	Aerial	Filamentus	Spare	8,5
6.	KLK 13.3	Sirkular	Cream to yellow	Cream to yellow	Flat	Cottony	Aerial	Filamentus	Dense	7,5
7.	Karamunting 14.11	Rhizoid	White	White to cream	Raised	Cottony	Aerial	Filamentus	Spare	3,65
8.	KRMT 2.7	Sirkular	White	Cream to yellow	Raised	Cottony	Aerial	Filamentus	Medium	3,1
9.	Padi 4.1	Sirkular	Chocolate	Yellow to chocolate	Flat	Velvety	Immerse	Filamentus	Medium	1,8

Karakteristik morfologi kapang tanah sulfat masam yang ditunjukkan pada Tabel 2 bervariasi. Isolat yang tumbuh memiliki bentuk sirkular, kecuali pada Karamunting 14.11 berbentuk rhizoid atau menyerupai akar, dan Padi 4.1 berbentuk irreguler atau tidak beraturan. Miselia *immerse* yang tidak tumbuh ke permukaan ditemui pada isolat Padi 4.1 dan Pakis 4.3, sedangkan isolat lainnya memiliki miselia aera yang tumbuh ke atas permukaan. Tepian dentate hanya ditemukan pada Pakis 4.3 sedangkan isolat lainnya memiliki tepian filamentus. Warna koloni isolat rata-rata menunjukkan warna putih dan warna kecokelatan.

Identifikasi Molekuler

Identifikasi secara molekuler perlu dilakukan untuk mengetahui identifikasi sampai pada tingkat spesies. Karena identifikasi dengan pengamatan

morfologi hanya dapat memberi kecocokan sampai tingkat genus. Sandy *et al.* (2015) menjelaskan bahwa identifikasi berdasarkan karakter morfologi tidak dapat digunakan untuk membedakan jamur hingga tingkat spesies, sedangkan karakter molekuler dapat digunakan untuk mengidentifikasi khamir atau kapang hingga tingkat spesies.

Identifikasi isolat kapang dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika secara parsial pada lokus Internal Transcribed Spacer (ITS) ribosomal DNA dengan menggunakan primer ITS4. Menurut Hayyati *et al.* (2017) identifikasi kapang endofit dengan menggunakan identifikasi molekuler memiliki kepekaan yang tinggi, cepat, dan akurat. Identitas kapang endofit dapat diketahui hingga tingkat spesies berdasarkan pada analisis BLAST hasil perunutan DNA.



Gambar 3. Morfologi Makroskopis Isolat Kapang Endofit pada Medium *Potato Dextrose Agar* (A) KLK 13.7, (B) KLK 13.3, (D) KRMT 2.7, (E) Padi 4,1, dan (F) Padi 5.2

Menurut Rahayu *et al.* (2015) identifikasi molekuler menggunakan daerah ITS merupakan tahap awal identifikasi molekuler, karena sekuens DNA berevolusi lebih cepat pada daerah ITS dibandingkan daerah gen lainnya. Daerah ITS dapat digunakan sebagai penanda genetika karena memiliki variasi sekuens yang cukup tinggi bahkan dalam spesies yang sama, dan semua fungi memiliki daerah ini.

Penjajaran (*aligment*) sekuens DNA dilakukan dengan menggunakan software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang ada pada situs NCBI. Identifikasi dilakukan dengan melihat perbandingan persentase kemiripan gen ITS isolat kapang endofit dengan beberapa sekuens DNA yang terdapat di Gen bank menggunakan BLAST. BLAST merupakan

program untuk mencari dan menganalisis kehomologian sekuens suatu organisme.

Berdasarkan analisis hasil penjajaran sekuens dengan software BLAST pada situs NCBI (Tabel 3), menunjukkan bahwa isolat dengan kode Pakis 4.3 memiliki homologi sekuens yang cukup tinggi dengan *Penicillium brefeldianum* CBS 254.55 dengan tingkat similaritas sekuens sebesar 99.82%, dan similaritas sebesar 100% pada spesies *Penicillium* sp. TSU-MF2, serta 99.62% pada spesies *Penicillium penarojense*. Menurut Yusuf *et al.* (2014), genus *Penicillium* memiliki hifa berseptata, konidiofor bercabang di ujung dan membentuk beberapa fialid, diujung bagian atas dari fialid terdapat untaian konidia. Konidia bersel satu dan berbentuk bulat.

Tabel 3 Hasil BLAST isolat kapang tanah sulfat masam berdasarkan analisis sekuens daerah ITS

No	Kode Isolat	MaxS Core	Similarity (%)	Accession	Hasil Identifikasi
1.	Pakis 4.3	1033	99.82%	MH857471.1	<i>Penicillium brefeldianum</i> CBS 254.55
		1026	100.00%	KX940917.1	<i>Penicillium</i> sp. TSU-MF2
		965	99.62%	NR_138289.1	<i>Penicillium penarojense</i> CBS 113178
2.	KRMT 17.9	998	100.00%	MH681594.1	<i>Clonostachys</i> sp. Bdf-4
		998	100.00%	EU552110.1	<i>Bionectria</i> cf. <i>Ochroleuca</i> CBS 113336
		983	99.45%	MK070105.1	<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>Catenulata</i> CBS 154.27
3.	Padi 5.2	1051	99.48%	MH268072.1	<i>Pseudallescheria</i> sp. JMB10 5B
		1035	98.80%	MH793590.1	<i>Scedosporium boydii</i> C.C. Lee AgFN4-8-2
		961	98.71%	NR_130665.1	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> CBS 418.73
4.	KLK 13.7	953	100.00%	NR_137877.1	<i>Penicillium singorense</i> CBS 138214
		1005	100.00%	JQ776541.1	<i>Penicillium dalea</i> SGE48
		1005	100.00%	LT558940.1	<i>Penicillium singorense</i> DI16-118
5.	Bth	1053	100.00%	MN585763.1	<i>Aspergillus niger</i> 1901NT-1.4.4
		1053	100.00%	MN535050.1	<i>Penaeus canaliculatus</i>
		1053	100.00%	NR_163668.1	<i>Aspergillus foetidus</i> CBS 121.28
6.	KLK 13.3	1013	100.00%	KY320594.1	<i>Aspergillus aculeatus</i> MR10
		1013	100.00%	MK280716.1	<i>Aspergillus aculeatinus</i> FP41a
		996	99.63%	NR_135330.1	<i>Aspergillus uvarum</i>
7.	Karamunting 14.11	998	100.00%	KY978584.1	<i>Fusarium solani</i> H918
		990	100.00%	MK333991.1	<i>Fusarium striatum</i> PB-71
		976	100.00%	AB513846.1	<i>Nectria ipomoeae</i>
8.	KRMT 2.7	1061	100.00%	MK791647.1	<i>Trichoderma asperellum</i> T-AS7
		1061	100.00%	MH333256.1	<i>Trichoderma viride</i> PF1
		1061	100.00%	MH127469.1	<i>Trichoderma harzianum</i> Th-4
9.	Padi 4.1	1057	99.83%	MH141230.1	<i>Aspergillus terreus</i> Y.H.Yeh V0103
		1057	99.83%	KY929276.1	<i>Aspergillus terreus</i> NIHHS505
		1031	99.82%	NR_131276.1	<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 1012

Penicillium mampu menghasilkan aktivitas selulase seperti yang dinyatakan oleh Howard *et al.* (2003) menunjukkan bahwa *Penicillium brefeldianum* mampu menghasilkan glukano-hidrolase yang dapat memecah senyawa selulosa, namun pada uji aktivitas glukanolitik spesies ini tidak menunjukkan terbentuknya zona bening. Hal ini dikarenakan ketidakcocokan pH pada medium yang menghambat pertumbuhan kapang dan menghambat aktivitas enzim yang dimiliki.

Isolat KRMT 17.9 menunjukkan tingkat similaritas sekuens sebesar 100.00% terhadap *Clonostachys* sp. Bdf-4 dan kemiripan sebesar 100.00% spesies *Bionectria cf. ochroleuca* CBS 113336 dan sebesar 99.45% spesies *Clonostachys rosea f. Catenulata* CBS 154.27. Menurut Anggeraini dan Wibowo (2009), *Clonostachys* merupakan salah satu jamur tanah yang bersifat saprofit, jamur ini memiliki konidiofor yang tegak, memiliki cabang sekunder, berseptat dan memiliki spora bulat. Hal ini sesuai dengan karakteristik konidia yang diamati secara mikroskopis dimana struktur konidia pada isolat KRMT 17.9 memiliki struktur konidia yang tegak dan bercabang. Isolat Padi 5.2 memiliki similaritas dengan beberapa sekuens DNA yang terdapat di genbank menggunakan BLAST dengan nilai persen identifikasi sebesar 99.48% dengan genus *Pseudallescheria* sp. JMB10 5B dan persen similaritas sebesar 98,80% pada spesies *Scedosporium boydii* C.C. Lee AgFN4-8-2 dan 98,71% kemiripan dengan spesies *Pseudallescheria ellipsoidea* CBS 418.73. Penelitian Amami dan Imaningsih. (2019) menjelaskan ciri-ciri makroskopis genus *Scedosporium* memiliki warna koloni putih sampai kecokelatan dengan tekstur lembut dan

bagian bawah dari isolat berwarna hitam. Ciri ciri mikroskopis yang dimiliki adalah miselium yang tersusun dari hifa bercabang dan memiliki sekat, terdapat konidia berbentuk bulat pada cabang sisi hifa.

Isolat KKK 13.7 menunjukkan adanya similaritas sekuens DNA di genbank sebesar 100% terhadap spesies *Penicillium singorense* CBS 138214, similaritas 100% pada spesies *Penicillium dalea* SGE48, dan 100% pada spesies *Penicillium singorense* DI16-118. Menurut Supiyanto *et al.* (2019) *Penicillium* biasanya memiliki koloni berwarna hijau, terkadang putih, sebagian besar memiliki konidiofor. Konidia berbentuk rantai panjang, divergent atau kolom, globular, elips atau fusiform, transparan atau kehijauan, dengan dinding mulus atau bergelombang.

Isolat Bth memiliki similaritas sebesar 100% pada spesies *Aspergillus niger* 1901NT-1.4.4, *Penaeus canaliculatus*, dan *Aspergillus foetidus* CBS 121.28. Sulistyarsi *et al.* (2016) menjelaskan *Aspergillus niger* memiliki hifa yang berseptat, dengan koloni dasar berwarna putih atau kuning dan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat sampai hitam pada medium. Kepala konidia berwarna hitam, bulat, cenderung memisah menjadi bagian-bagian yang lebih longgar dengan bertambahnya umur. Konidiospora memiliki dinding yang halus, hialin juga berwarna coklat. Karakteristik sangat cocok dengan morfologi yang teramati secara makroskopis pada isolat Bth.

Bedasarkan data yang diunjukkan pada Tabel 4. Diketahui bahwa isolat KKK 13.3 memiliki similaritas sebesar 100% pada spesies *Aspergillus aculeatus* MR10, dan *Aspergillus aculeatinus* FP41a, serta similaritas sebesar 99.63% pada spesies *Aspergillus uvarum*.

Pelczar dan Chan (2005) mengatakan *Aspergillus* memiliki hifa yang berwarna putih atau kuning dengan lapisan konidiospora tebal berwarna coklat sampai hitam. Kepala konidia berwarna hitam, bulat, dan cenderung memisah dengan bertambahnya umur. Hasanah (2017) menambahkan spora *Aspergillus* tersebar bebas di udara terbuka.

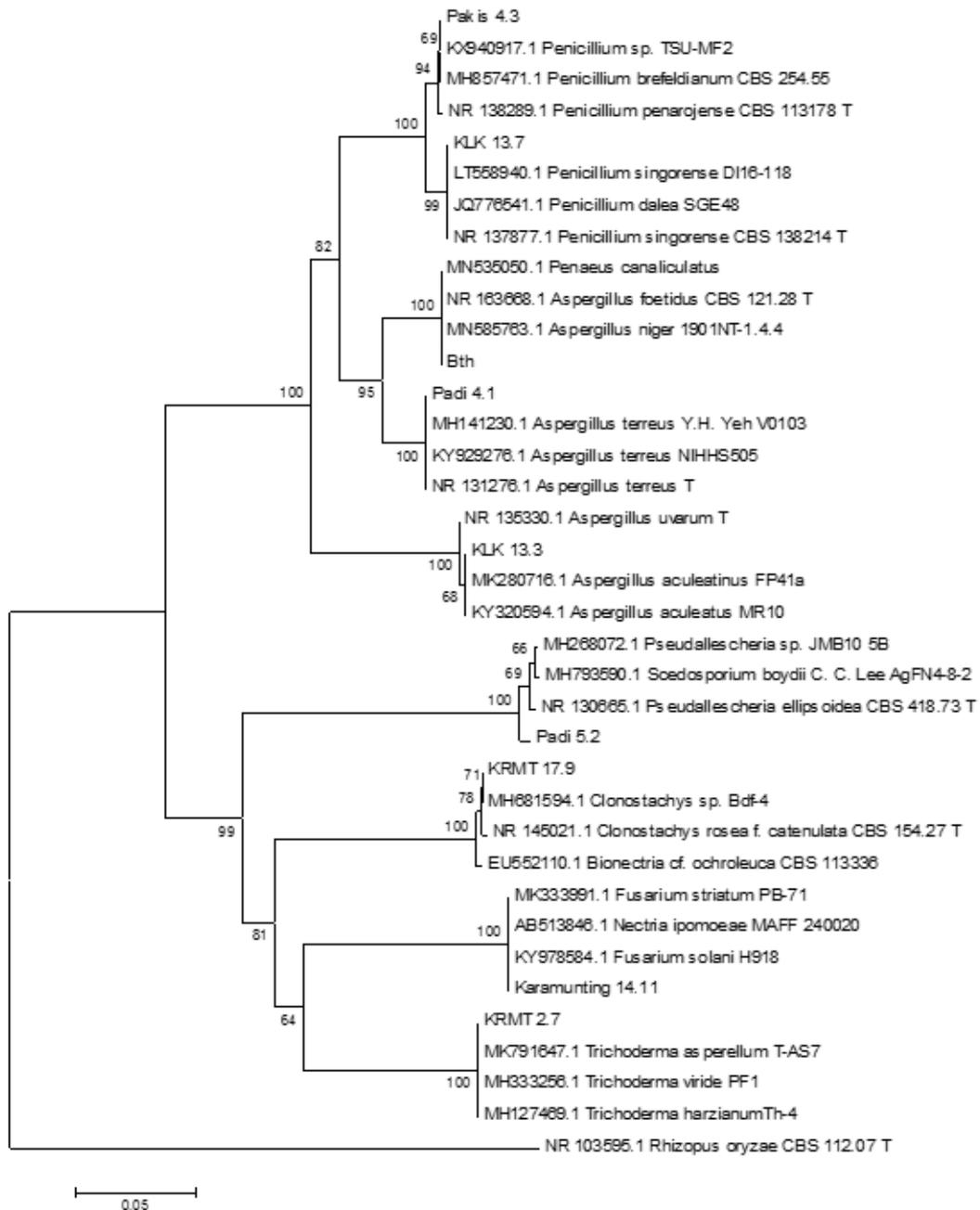
Isolat Karamunting 14.11 setelah dilakukan analisis dengan menggunakan BLAST menunjukkan persen identifikasi sebesar 100% terhadap spesies *Fusarium solani* H918, *F. striatum* PB-71, dan *Nectria ipomoeae*. Menurut Sutejo *et al.* (2008) *Fusarium* memiliki mikrokonidia dan makrokonidia. Mikrokonidium tersebar pada kultur sampai terbentuk dalam jumlah yang melimpah, secara umum bersel tunggal, berbentuk oval atau ginjal. Mikrokonidium memiliki dinding tebal. Makrokonidium terbentuk dalam jumlah yang melimpah, gemuk dan berdinding tebal. Isolat KRMT 2.7 memiliki similaritas sebesar 100% pada spesies *Trichoderma asperellum* T-AS7, *Trichoderma viride* PF1, *Trichoderma harzianum* Th-4. Menurut Uruilal *et al.* (2012) karakteristik *Trichoderma* memiliki koloni berwarna putih dengan miselia yang longgar atau padat. Warna koloni dipengaruhi oleh pigmen fialosfor, jumlah spora dan pH medium. Morfologi koloni bergantung pada media pertumbuhan, pada media dengan nutrisi terbatas koloni tampak transparan, sedangkan pada media yang nutrisinya lebih banyak koloni dapat terlihat lebih putih, dengan konidia yang dapat terbentuk dalam seminggu berwarna kuning, hijau atau putih. Isolat Padi 4.1 memiliki similaritas sebesar 99,83% dengan spesies *Aspergillus terreus* Y.H.Yeh V0103, *Aspergillus terreus* NIHHS505, dan similaritas

sebesar 99,82% pada spesies *Aspergillus terreus* ATCC 1012. Hermawati *et al.* (2014) menjelaskan *Aspergillus terreus* memiliki hifa berseptat dan hialin, dengan kepala konidia yang biserial dan kolumnar, konidia berdinding halus dan secara makroskopis memiliki koloni yang berwarna coklat krem dan memiliki koloni yang padat. Karakteristik ini sesuai dengan hasil pengamatan morfologi isolat Padi 4.1.

Hasil penyejajaran data sekuens DNA digunakan untuk membuat kontruksi pohon filogeni dengan menggunakan program *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) X. Menurut Sudirga. (2016), analisis filogenetik menggunakan MEGA X dilakukan dengan mencari similaritas antar sekuen kemudian membuat pohon filogenetik menggunakan program MEGA X.

Hasil sekuensing DNA dari isolat kapang endofit dikonstruksi dalam pohon filogenetik. Pohon filogenetik dibuat menggunakan software MEGA X, dengan metode *Neighbor-Joining Tree* model Kimura 2-Parameter (K2P) dan bootstrap 1.000 replikasi. Pohon filogenetik dapat digunakan untuk melihat kekerabatan dan jarak genetik suatu spesies. Jarak genetik sendiri terjadi karena perbedaan secara genetik antar populasi karena mutasi, seleksi, persilangan acak, dan penghanyutan gen yang menyebabkan terjadinya evolusi.

Berdasarkan analisis sekuens DNA daerah ITS dengan pohon filogenetik (Gambar 1), menunjukkan bahwa isolat pakis 4.3 berada dalam satu klade bersama sekuens kapang *Penicillium* sp. TSU-MF2 dengan nilai *bootstrap* sebesar 69%. Isolat pakis 4.3 teridentifikasi sebagai *Penicillium* sp. dikarenakan nilai homologi yang dimiliki sebesar 100%.



Gambar 1 Pohon Filogenetik Isolat Kapang Asal Tanah Sulfat Masam Kalimantan Selatan

Isolat KRMT 17.9 berada dalam satu klade bersama sekuens kapang *Clonostachys* sp. Bdf-4 dengan nilai *bootstrap* sebesar 71%. Isolat KRMT 17.9 teridentifikasi sebagai *Clonostachys* sp. dikarenakan nilai homologi sebesar 100%.

Isolat Padi 5.2 berada dalam satu klade bersama sekuens-sekuens kapang *Pseudallescheria ellipsoidea* CBS 418.73 dan *Scedosporium boydii* CC.Lee AgFN4-8-2, dengan nilai *bootstrap* sebesar 100%. Isolat Padi 5.2 teridentifikasi sebagai isolat *Scedosporium boydii* dengan nilai homologi sebesar 98.80%.

Isolat KLK 13.7 berada dalam satu klade bersama sekuens-sekuens *Penicillium singorense* DI16-118, *Penicillium dalea* SGE 48, *Penicillium singorense* CBS 138214T dengan nilai *bootstrap* sebesar 99%. Isolat KLK teridentifikasi sebagai isolat *Penicillium singorense* dengan nilai homologi sebesar 100%.

Isolat Bth berada dalam satu klade bersama sekuens-sekuens kapang *Aspergillus niger* 1901NT-1.4.4, *Aspergillus foetidus* CBS121.28T, *Penaeus canaliculatus* dengan nilai *bootstrap* sebesar 100%. Isolat Bth teridentifikasi sebagai isolat *Aspergillus niger* dengan nilai homologi sebesar 100%.

Isolat KLK 13.3 berada dalam satu klade bersama sekuens-sekuens *Aspergillus uvarum*, *Aspergillus aculeatinus* FP41a, *Aspergillus aculeatus* MR10 dengan nilai *bootstrap* sebesar 100%. Isolat KLK 13.3 teridentifikasi sebagai isolat *Aspergillus aculeatinus* FP41a dengan nilai homologi sebesar 100%.

Isolat karamunting 14.11 berada dalam satu klade bersama sekuens-sekuens kapang *Fusarium solani* H918, *Fusarium striatum* PB-71, dan *Nectria ipomoeae* MAFF 240020 dengan nilai *bootstrap* sebesar 100%. Isolat karamunting 14.11 teridentifikasi sebagai isolat *Fusarium solani* dengan nilai homologi sebesar 100%.

Isolat KRMT 27 berada dalam satu klade bersama sekuens-sekuens kapang *Trichoderma asperellum* T.AS7, *Trichoderma viridae* PF1, *Trichoderma harzianum* Th-4 dengan nilai *bootstrap* sebesar 100%. Isolat KRMT 27 teridentifikasi sebagai isolat *Trichoderma asperellum* dengan nilai homologi sebesar 100%.

Isolat Padi 4.1 berada dalam satu klade bersama sekuens-sekuens kapang *Aspergillus terreus* Y.H. Yeh V0103, *Aspergillus terreus* NIHHS 505, *Aspergillus terreus* T dengan nilai *bootstrap* sebesar 100%. Isolat Padi 4.1 teridentifikasi sebagai isolat *Aspergillus terreus* dengan nilai homologi sebesar 100%.

Nilai *bootstrap* memperlihatkan cukup tingginya tingkat kepercayaan klade yang terbentuk. Semakin besar nilai *bootstrap* yang muncul maka semakin tinggi tingkat kepercayaan pohon hasil rekonstruksi. Menurut Simpson (2006), nilai *bootstrap* diantara 70-100 menunjukkan bahwa percabangan dan pohon filogenetik tidak akan berubah.

KESIMPULAN

Isolat kapang asal tanah sulfat masam Kalimantan Selatan memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam memproduksi sejumlah enzim ekstraseluler. Pada pengujian pektinase, kitinase dan glukonase semua isolat menunjukkan hasil yang negatif. Isolat yang potensial dalam menghasilkan enzim ekstraseluler diantaranya *Penicillium* sp. Padi 4.1 (indeks selulolitik 2.43), *Clonostachys* sp. KRMT 17.9 dan *Penicillium singorense* KLK 13.7 (masing-masing indeks proteolitik 3.97 dan 3,00).

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada teknisi laboratorium mikrobiologi BB. Biogen (Siti Aminah, Jajang Kosasih), mahasiswa praktek dari UNSRI Palembang (Bebby, Vivid, dan Vina) yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini, serta kepada Bapak Mastur selaku kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik

Pertanian, (BB. Biogen) sebagai tempat pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anand, A. A. P., Vennison, S. J., Sankar, S. G., Prabhu, D. I. G., Vasan, P. T., Raghuraman, T., Geoffrey, C. J., dan Vendan, S. E. 2009. *Isolation and Characterization of Bacteria from the Gut Of Bombyx Mori that Degrade Cellulose, Xylan, Pectin and Starch and Their Impact on Digestion. Journal of Insect Science.* 10(107): 1-20.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi.* APS Press. St. Paul, Minnesota: USA.
- Elfiati, D., Delvian, Hamidah H. 2016. *Indeks Pelarutan Fungi Pelarut Fosfat dengan Menggunakan Empat Sumber Fosfat.* Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal. 1(1): 287-296.
- Hanafiah, K.A., Anas, I., Napoleon, A., dan Ghofar, N. 2005. *Biologi Tanah Ekologi & Makrobiologi Tanah.* PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 166.
- Haryono., Muhammad, N., Haris, S., Muhrizal, S. 2013. *Lahan Rawa Penelitian dan Pengembangan.* Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Jakarta.
- Hasanah, U. 2017. *Mengenal Aspergillus, Infeksi Jamur Genus Aspergillus.* Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera. 15 (2): 76-86.
- Hayyati, N. S., Agung, S., Budi, R., dan Kristiani D. 2017. *Isolasi dan karakterisasi Kapang Endofit dari Pegagan (Centella asiatica (L.) Urban).* Jurnal Biologi. 6(2): 66-74.
- Hermawati, I. R., Sudarno., dan Handijatno, D. 2014. *Uji Potensi Antifungi Perasan Daun Seledri (Apium graveolens L.) terhadap Aspergillus terreus secara In Vitro.* Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan. 6 (1): 37-42.
- Herdyastuti, N., Raharjo, T. J., Mudasir, dan Matsjeh.S. 2009. *Chitinase and Chitinolytic Microorganism: Isolation, Characterization, and Potential.* Indo J. Chem. 9 (1): 37-47.
- Howard R. L., Abotsi E., Rensburg E.L.I., dan Howard S. 2003. *Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production.* African Journal of Biotechnology. 2 (12): 602-619.
- Jumiyati, Siti H. B., dan Ibnul M. 2012. *Isolasi dan Identifikasi Khamir secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang.* Jurnal Biosantifika. 4(1): 27-35.
- Marista, E., Siti K., dan Riza L. 2013. *Bakteri Pelarut Fosfat Hasil Isolasi dari Tiga Jenis Tanah Rizosfer Tanaman Pisang Nipah (Musa paradisiaca var. Nipah) di Kota Singkawang.* Jurnal PROTOBIONT. 2 (2): 93-101.
- Mukhlis. 2010. *Mikroba Tanah Rawa dan Pemanfaatannya Sebagai Biofertilizer dan Bioremediator.* KEMENTAN.
- Mukhlis. 2014. *Biodegradasi Bahan Organik oleh Mikroba dan Pengaruhnya Terhadap Tanaman Padi di Lahan Gambut.* AGRIC. 26(1 & 2): 37 – 44.
- Munifah I., Chasanah E., Fawzya Y. N. 2011. *Screening of cellulolytic bacteria from Indonesia's marine environment.* Prosiding International Seminar of

- Indonesian Society for Microbiology*. Bogor: Perhimpunan Mikrobiologi.
- Nasarna, S., Ariyani, F., dan Indrianti, N. 2013. *Produksi Kitinase dan Kitin Deasetilase dari Vibrio harveyi*. Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia. 9 (5): 33-38.
- Pelczar, M.J., dan Chan, E.C.S. 2005. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Raharjo, B., Agung, S., dan Agustina, D. 2007. *Pelarutan Fosfat Anorganik oleh Kultur Campur Jamur Pelarut Fosfat Secara In Vitro*. Jurnal Sains dan Matematika. 15(2): 45-54.
- Rahayu, F., Saryono dan Titania, T. N. 2015. *Isolasi DNA dan Amplifikasi PCR daerah ITS rDNA Kapang Endofit Umbi Tanaman Dahlia (Dahlia variabilis) LBKURCC69.JOM FMIPA*. 2(1): 100-108.
- Rahayu, S., Handojo, H. N., dan Rahman, G. P. 2015. *Karakter Jamur Ceratocystis sp. Penyebab Penyakit Busuk Batang pada Acacia Decurrens dan Status Penyakitnya di Taman Nasional Gunung Merapi, Yogyakarta*. Jurnal Ilmu Kehutanan. 9(2): 94-104.
- Sandy, Y. A., Syamsuddin, D., dan Antok W. S. 2015. *Identifikasi Molekuler Jamur Antagonis Trichoderma Harzianum Diisolasi dari Tanah Pertanian di Malang, Jawa Timur*. Jurnal HPT. 3(3):1-8.
- Suastika, I. W., Hartatik, W., & Subiksa, I. G. M. 2006. *Karakteristik dan teknologi pengelolaan lahan sulfat masam mendukung pertanian ramah lingkungan*. Balai Penelitian Tanah.
- Sulistiyarsi, A., Pujiati., dan Ardhi, W. 2016. *Pengaruh Konsentrasi dan Lama Inkubasi terhadap Kadar Protein Crude Enzim Selulase dari Kapang Aspergillus niger*. Prociding Biology Education. 13 (1): 781-786.
- Sumarlin, L. O., Mulyadi, D., Suryatna., dan Asmara, Y. 2013. *Identifikasi Potensi Enzim Lipase dan Selulase pada Sampah Kulit Buah Hasil Fermentasi*. Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia. 18 (3): 159-166.
- Sumarsih, S, 2003, *Mikrobiologi Dasar*. Universitas Pembangunan Nasional Veteran, Yogyakarta.
- Supiyanto., Rosa,E., Irawan,B., dan Nukmal, N. 2019. *Isolasi dan Uji Patogenitas Isolat Fungi Entomopatogen terhadap Stadium Dewasa Nyamuk Aedes Aegypti*. Jurnal Biologi Papua. 11 (1): 33–41.
- Sutejo, A. M., Priyatmojo, A., dan Wibowo, A. 2008. *Identifikasi Morfologi Beberapa Spesies Jamur Fusarium*. Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia. 14 (1): 7-13.
- Thomas, D.B., 1984. *A textbook of industrial microbiology*. Sinaver Associates, Sunderland, USA.
- Ulfiyati, N. dan Enny Z. 2015. *Isolat Bacillus Pelarut Fosfat dari Kalimas Surabaya*. Jurnal Sains dan Seni ITS. 4(2): 81-83.
- Urulil, C., Kalay, A. M., Kaya, E., dan Siregar, A. 2012. *Pemanfaatan Kompos Ela Sagu, Sekam dan Dedak sebagai Media Perbanyakan Agens Hayati Trichoderma harzianum.1 (1): 21-30*.

White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. 1990. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*. In PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press.

Widyastuti, N., dan Ilyas, M. 2012. *Aktivitas dan Karakter Kitinase Isolat Trichoderma sp. W3A4 Asal Kepulauan Raja Ampat Papua Barat*. Biosfera. 29 (1): 1-7.

