

UJI TOLERANSI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT AKAR *Tridax
procumbens* DARI TANAH TERCEMAR SENG (Zn) DI PERTAMBANGAN
MINYAK DESA WONOCOLO, BOJONEGORO, JAWA TIMUR

SKRIPSI

Oleh:

INA AODIYAH

NIM. 15620074



JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2019

UJI TOLERANSI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT AKAR *Tridax procumbens* DARI TANAH TERCEMAR SENG (Zn) DI PERTAMBANGAN MINYAK DESA WONOCOLO, BOJONEGORO, JAWA TIMUR

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan
dalam Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Oleh:

INA AODIYAH

NIM. 15620074

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM

MALANG

2019

UJI TOLERANSI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT AKAR *Tridax procumbens* DARI TANAH TERCEMAR SENG (Zn) DI PERTAMBANGAN MINYAK DESA WONOCOLO, BOJONEGORO, JAWA TIMUR

SKRIPSI

Oleh:

INA AODIYAH

NIM. 15620074

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:

Tanggal

Pembimbing I,



Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si

NIP. 19650509 199903 2 002

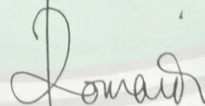
Pembimbing II,



Dr. Ahmad Barizi, M.A

NIP. 197312 2 199803 1 008

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Romaidi, M.Si., D.Sc

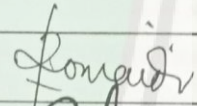
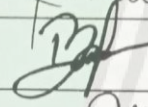
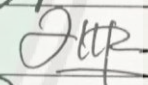
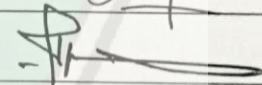
NIP.19810201 200901 1 019

UJI TOLERANSI DAN IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT AKAR *Tridax procumbens* DARI TANAH TERCEMAR SENG (Zn) DI PERTAMBANGAN MINYAK DESA WONOCOLO, BOJONEGORO, JAWA TIMUR

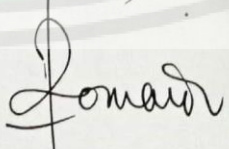
SKRIPSI

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal

Penguji Utama	Romaidi, M.Si., D.Sc NIP. 19810201 200901 1 019	
Ketua Penguji	Bayu Agung Prahardika, M.Si NIP. 19900807 201903 1 011	
Sekretaris Penguji	Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si NIP. 19650509 199903 2 002	
Anggota Penguji	Dr. Ahmad Barizi, M.A NIP. 19731212 199803 1 001	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi


Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ina Aodiyah
NIM : 15620074
Fakultas/Jurusan : Sains dan Teknologi /Biologi
Judul Penelitian : Uji Toleransi dan Identifikasi Fungi Endofit Akar *Tridax Procumbens* dari Tanah Tercemar Seng (Zn) di Pertambangan Minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro, Jawa Timur

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa hasil penelitian ini tidak terdapat unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali secara tertulis dikutip dalam naskah dan disebutkan dalam sumber kutipan atau daftar pustaka. Apabila pernyataan hasil penelitian ini terbukti terdapat unsur penjiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggung jawabkan serta diproses sesuai dengan peraturan yang berlaku.

Malang, September 2019

Yang Membuat Pernyataan



Ina Aodiyah

NIM. 15620074

MOTTO

ادْعُوا اللَّهَ وَأَنْتُمْ مُوقِنُونَ بِالْإِجَابَةِ وَاعْلَمُوا أَنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَجِيبُ دُعَاءَ مَنْ قَلْبٍ غَافِلٍ لَاهٍ

“Berdoalah kepada Allah dalam keadaan yakin akan dikabulkan, dan ketahuilah bahwa Allah tidak mengabulkan doa dari hati yang lalai.”

(HR. Tirmidzi no. 3479)



HALAMAN PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Skripsi ini saya persembahkan kepada orang-orang tersayang saya dan paling berpengaruh di dalam hidup saya terkhusus pada kedua orang tua tercinta Bapak Slamet dan Ibu Titin Suwarni yang telah memberikan support doa dan materi atas kelancaran skripsi ini. Doa di setiap sujud sholatmu tak lupa menyebut nama kedua anakmu, semoga Allah SWT menghadiahkan surga untukmu. Tak lupa kepada adek tercinta Moch. Ary Dwi Yanto terima kasih telah menghimbau mbakmu ini disaat mulai lelah dan letih, semoga kamu diberi kelancaran di dalam urusanmu, maaf belum bisa menjadi mbak yang baik untukmu.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahnyalah penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan berjudul “Uji Toleransi dan Identifikasi Fungi Endofit Akar *Tridax Procumbens* dari Tanah Tercemar Seng (Zn) di Pertambangan Minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro, Jawa Timur”. Sholawat serta salam tak lupa terpanjatkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang memberikan bimbingan menuju jalan yang rahmatil lil alamin.

Penyusunan skripsi ini tentu tidak mampu terselesaikan jik tidak adanya bimbingan, arahan, dukungan dan support dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada:

1. Prof. Dr. H. Abd. Haris, M. Ag. Selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M. Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M.Si, D.Sc, selaku Ketua Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus dosen kedua penguji yang memberikan pengarahan dan bimbingan kepada penulis akan penelitian skripsi ini.
4. Dr. Hj Ulfah Utami, M.Si, dan Dr. Ahmad Barizi, M.A selaku dosen pembimbing yang sudah bersabar, memberikan bimbingan dan pengarahan kepada penulis akan penyusunan skripsi ini.

5. Bayu Agung Prahardika, M.Si selaku dosen penguji skripsi yang telah memberikan saran, nasehat dan kritiknya untuk kelancaran penyusunan skripsi ini.
6. Seluruh dosen, laboran, staf di jurusan biologi yang membantu memberikan kemudahan, terimakasih atas ilmu yang telah diberikan selama kurang lebih 4 tahun ini.
7. Kedua orang tua tercinta Bapak Slamet dan ibu Titin Suwarni yang selalu mendoakan dan memberi support kepada penulis.
8. Teman-teman Biologi C 2015, tim Mikro (Atik, Devi, Septian, Malik, Anita), mas Hari, mbak Inna, sahabatku Andini terima kasih telah menemaniku, mensupportku, menghiburku, dan membantuku, dan mendoakanmu semoga kesuksesan menjadi hadiah kalian nanti.
9. Sahabatku Fanny, Luki, Arik, Nova, Ulfa, dan Anin. Terima kasih atas doa yang kalian khususkan kepadaku.
10. Adek-adek angkatan 2016 dan 2017 terima kasih supportnya, semoga penelitian ini memberikan manfaat untuk kalian.
11. Terima kasih Abang yang selalu aku repotkan, namun tetap mendoakanku dan mensupportku untuk cepat menyelesaikan tugas ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini memberi manfaat kepada pembacanya. Aamiin.

Malang, 2019

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PERSETUUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
MOTTO.....	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xiv
ABSTRAK.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
مستخلص البحث.....	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	7
1.3. Tujuan.....	7
1.4. Hipotesis.....	8
1.5. Manfaat Penelitian.....	8
1.6. Batasan Masalah Penelitian.....	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1. Gletang (<i>Tridax procumbens</i>).....	10
2.1.1. Klasifikasi Gletang (<i>Tridax procumbens</i>).....	10
2.1.2. Morfologi Gletang (<i>Tridax procumbens</i>).....	10
2.1.3. Toleransi Gletang (<i>Tridax procumbens</i>) Terhadap Logam Berat.....	11
2.2. Logam Seng (Zn).....	12
2.2.1. Seng Dalam Lingkungan.....	13

2.2.2. Toksikologi Logam Zn	15
2.3. Deskripsi Fungi	17
2.3.1. Keuntungan dan Kerugian Fungi.....	20
2.3.2. Fungi Endofit	21
2.3.3. Asosiasi Fungi Endofit dengan Tanaman Inangnya	22
2.4. Toleransi Fungi Terhadap Logam Berat	24
2.4.1. Interaksi Fungi dengan Logam Berat	24
2.4.2. Toleransi Fungi	26
2.4.3. Mekanisme Fungi Mereduksi Logam Berat.....	28
BAB III METODE PENELITIAN.....	33
3.1. Rancangan Penelitian	33
3.2. Waktu dan Tempat Penelitian	33
3.3. Alat dan Bahan.....	34
3.3.1. Alat	34
3.3.2. Bahan.....	34
3.4. Prosedur Penelitian	35
3.4.1. Sterilisasi Alat dan Bahan	35
3.4.2. Pembuatan Media	35
3.4.3. Peremajaan Isolat Jamur Endofit	36
3.4.4. Uji Toleransi Fungi terhadap Logam Zn.....	36
3.4.5. Identifikasi Morfologi Isolat Terpilih.....	37
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	43
4.1. Kemampuan Toleransi Fungi Endofit Akar Gletang (<i>Tridax procumbens</i>) terhadap Logam Zn.....	43
4.2. Identifikasi Morfologi dan Molekuler Isolat Fungi Endofit	49
4.2.1 Identifikasi Morfologi.....	49
4.2.2. Identifikasi Molekuler.....	51
BAB V PENUTUP	57
5.1 Kesimpulan	57
5.2. Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58

LAMPIRAN.....	68
---------------	----



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Tumbuhan Gletang (*Tridax procumbens*).....11

Gambar 2.2. Beberapa Fungi Tropik yang Umum Ditemukan.....19

Gambar 2.3. Simbiosis Mikroba Endofit dengan Tanaman Inangnya.....23

Gambar 2.4. Potongan Melintang Dinding Sel Fungi Secara Umum.....26

Gambar 2.5. Mekanisme Seluler Toleransi Logam pada Fungi.....28

Gambar 4.1. Pengaruh Variasi Konsentrasi Logam Zn 5, 10, 20, 50, 100 ppm terhadap Nilai Indeks Toleransi 11 Isolat Fungi.....44

Gambar 4.2. Isolat Fungi kode L2U1A pada Konsentrasi yang Berbeda.....45

Gambar 4.3. Pengaruh Variasi Konsentrasi Logam Zn 200, 300, 400, 500, 600, 700 ppm terhadap Nilai Indeks Toleransi 2 Isolat Fungi.....46

Gambar 4.4. Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis.....51

Gambar 4.5. Hasil Visualisasi PCR dengan Menggunakan Gel Doc.....54

Gambar 4.6. Rekonstruksi Pohon Filogenetik Isolat Fungi Endofit dari Akar *Tridax procumbens*.....56

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.Sekuens Primer.....40

Tabel 3.2. Komposisi Bahan dan Volume Amplifikasi DNA.....41

Tabel 3.3. Prosedur PCR.....41

Tabel 4.1. Karakter Morfologi Isolat Fungi Endofit Terpilih Secara Makroskopis dan Mikroskopis.....49

Tabel 4.2. Hasil Proses BLAST untuk Nilai Homology (99%).....55

ABSTRAK

Aodiyah, Ina. 2019. Uji Toleransi dan Identifikasi Fungi Endofit Akar *Tridax Procumbens* dari Tanah Tercemar Seng (Zn) di Pertambangan Minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro, Jawa Timur. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Dr. Hj Ulfah Utami, M.Si,. Pembimbing Agama: Dr. Ahmad Barizi, M.A.

Kata kunci: Toleransi, Identifikasi, Fungi Endofit, *Tridax procumbens*, Seng (Zn)

Pertambangan minyak tradisional di Indonesia yang masih aktif hingga saat ini adalah pertambangan minyak di Wonocolo, Bojonegoro, Jawa Timur. Aktivitas pertambangan ini mengakibatkan pencemaran logam berat di lingkungan. Menurut uji pendahuluan kandungan Zn di pertambangan berkisar 11,56-18,20 ppm, hal ini melampaui batas maksimal aman oleh *Ambient Multimedia Environment Goal* (AMEG) yaitu 4,0 mg/kg. *Tridax procumbens* sebagai tanaman hiperakumulator yang ditemukan di lokasi pertambangan mempunyai kemampuan toleran logam Zn, begitu pula dengan fungi endofit di dalam jaringannya. Identifikasi fungi endofit dilakukan untuk mengetahui spesies fungi yang toleran terhadap logam Zn. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui spesies fungi endofit akar *T. Procumbens*, yang memiliki kemampuan toleran logam Zn hingga konsentrasi tinggi. Metode yang digunakan; menguji fungi endofit dengan konsentrasi logam $ZnCl_2 \cdot H_2O$ yang berbeda 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, dan 700 ppm. Satu isolat fungi yang memiliki nilai TI tertinggi diidentifikasi morfologi dan molekuler menggunakan analisis rDNA ITS, *sequencing*, dan rekonstruksi filogenetik. Hasil dari penelitian ini yaitu didapatkan isolat fungi L2U1A yang mampu toleran terhadap logam Zn hingga konsentrasi 700 ppm, memiliki morfologi permukaan atas yang berwarna coklat muda dengan tepi putih dan bertekstur halus, sedangkan pada bagian sebaliknya koloni berwarna coklat kekuningan, hifa bersekat dan bercabang, panjang hifa antara sekat yaitu 75,26 μm , lebar 153,86 μm , dan berbentuk elips. Identifikasi molekuler dengan penandaan primer ITS 1 dan ITS 4 didapatkan isolat fungi jenis *Aspergillus terreus* strain 1B61. Kesimpulan dari penelitian ini yaitu terdapat satu isolat fungi endofit yang toleran hingga konsentrasi 700 ppm dapat digunakan untuk aplikasi lebih lanjut pada limbah yang mengandung logam berat.

ABSTRACT

Aodiyah, Ina. 2019. Tolerance Test and Identification of *Tridax Procumbens* Root Endophytic Fungi from Zinc Polluted Land in the Oil Mining Village of Wonocolo Village, Bojonegoro, East Java. Essay. Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Lecture of Biology : Dr. Hj Ulfah Utami, M.Sc., Lecture of Religion: Dr. Ahmad Barizi, M.A.

Keywords: Tolerance, Identification, Endophytic Fungi, *Tridax procumbens*, Zinc (Zn)

Traditional oil mining in Indonesia which is still active today is oil mining in Wonocolo, Bojonegoro, East Java. This mining activity results in heavy metal pollution in the environment. According to preliminary tests of Zn content in mining ranging from 11.56-18.20 ppm, this exceeds the maximum safe limit by the Ambient Multimedia Environment Goal (AMEG) of 4.0 mg / kg. *Tridax procumbens* as a hyperaccumulator plant found in mining sites has the ability to tolerate Zn metals, as well as endophytic fungi in their tissues. Identification of endophytic fungi was carried out to determine the species of fungi that are tolerant of Zn metal. This study aims to determine the species of *T. procumbens* root endophytic fungi, which have a tolerant ability of Zn metals to high concentrations. The method used; tested endophytic fungi with different $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ metal concentrations of 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, and 700 ppm. One fungi isolate that has the highest TI value was identified morphologically and molecularly using ITD rDNA analysis, sequencing, and phylogenetic reconstruction. The results of this study were obtained L2U1A fungi isolates that were able to tolerate Zn metals up to a concentration of 700 ppm, had a top surface morphology that was light brown with a white edge and smooth texture, whereas in the opposite part the colony was yellowish brown, hyphae hypnotic and branched, long hyphae between baffles are 75.26 μm , width 153.86 μm , and elliptical shape. Molecular identification with primary markings ITS 1 and ITS 4 obtained fungi isolates of *Aspergillus terreus* strain type 1B61. The conclusion of this study is that there is one endophytic fungi isolate that tolerates to use for further applications in waste containing heavy metal.

مستخلص البحث

عودية، إينا. 2019. اختبار تجاوز وتحديد الفطريات الداخلية الجذرية *Tridax Procumbens* من الأرض الملوثة بالزنك في تعدين النفط حي ونوجولو، بوجونيجورو، جاوى الشرقية. الأطروحة. قسم علم الأحياء. كلية العلوم والتكنولوجيا. جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية بمالانج. مشرفة علم الأحياء: الدكتورة الحاجة أولفة أوتامي، الماجستير. مشرف علم الدين: الدكتور أحمد بارزي، الماجستير.

الكلمات الأساسية: التسامح، التحديد، الفطريات الداخلية، *Tridax procumbens*، الزنك

في إندونيسيا تعدين النفط التقليدي الذي لا يزال نشطا حتى اليوم هو تعدين النفط في ونوجولو، بوجونيجورو، جاوى الشرقية. هذا نشاط التعدين يؤدي إلى تلوث المعادن الثقيلة في البيئة. وفقا للاختبار المقدم لمحتوى الزنك في التعدين حول 11,56 - 18,20 جزء في المليون، وهذا الحال يتجاوز الحد الأقصى للأمن من خلال *Ambient Multimedia Environment Goal (AMEG)* وهو 4.0 ميلغرام / كيلغرام. *Tridax procumbens* كنبات فرط التراكم الذي يوجد في مواقع التعدين له القدرة على تحمل معادن الزنك، وكذلك الفطريات الداخلية في أنسجتها. تم إجراء تحديد الفطريات الداخلية لمعرفة أنواع الفطريات التي تتجاوز المعدن الزنك. يهدف هذا البحث لمعرفة أنواع الفطريات الداخلية الجذرية *T. Procumbens* التي لها قدرة تجاوز معدن الزنك على التركيزات العالية. المنهج المستخدم اختبار الفطريات الداخلية مع تركيزات H_2O ، $ZnCl_2$ المختلفة من 0، 5، 10، 20، 50، 100، 200، 300، 400، 500، 600 و 700 جزء في المليون. تم تحديد إحدى الفطريات المعزولة التي لها أعلى قيمة شكليا وجزيئا باستخدام تحليل، rDNA ITS، والتسلسل وإعادة البناء التطوري. ونتائج هذا البحث لعزل الفطريات L2U1A التي تتجاوز إلى معدن الزنك حتى التركيز 700 جزء في المليون، وكان التشكيل السطح العلوي الذي بني فاتح مع حافة بيضاء والملمس أملس، أما في العكس مصفر، المنومة والمتفرعة، خيوط بين يحير 75,26 ميكرون، عرضه 153,86 ميكرون وشكله البيضاوي. التحديد الجزيئي مع العلامة الأولية حصل كل من ITS 1 و ITS 4 على عزل للفطريات من نوع *Aspergillus terreus* strain 1B61. الخلاصة من هذا البحث هي أن هناك الفطريات التي تتجاوز حتى التركيز 700 جزء في المليون يمكن استخدامها لتطبيقات أهرة فب النفايات التي تحتوي على المعادى الثقيلة.

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia adalah negara dengan memiliki kekayaan hasil bumi yang melimpah, baik dari segi pertanian maupun pertambangan. Hampir disemua pulau besar di Indonesia memiliki pertambangan. Pertambangan ini meliputi tambang batu bara, minyak, emas, dan timah. Salah satu pertambangan di Indonesia yang sudah dimulai sejak zaman penjajahan adalah pertambangan minyak di Wonocolo, Kabupaten Bojonegoro, Jawa Timur, hal ini dibuktikan dengan ditemukannya sumur-sumur tua yang berusia puluhan tahun. Menurut data milik Dirjen dan Dept ESDM sumur tua di Indonesia menyebar mulai dari Seram sebanyak 100 sumur, Kalimantan selatan sebanyak 100 sumur, Papua sebanyak 228 sumur, Sumatra Tengah sebanyak 1.633, Sumatra Utara sebanyak 2.392 sumur, Jawa Tengah dan Jawa Timur sebanyak 2.496, Kalimantan Timur sebanyak 3.143 sumur, Sumatra selatan sebanyak 3.623 sumur, dengan total sumur yang masih aktif sampai sekarang sebanyak 745 sumur (Naumi, 2015).

Pertambangan minyak di Desa Wonocolo Kabupaten Bojonegoro secara ekonomis berdampak positif terhadap kehidupan masyarakat di sekitar desa, yaitu mampu menunjang keuangan untuk melengkapi kebutuhan primer maupun kebutuhan sekunder, tetapi pertambangan minyak ini juga memiliki dampak negatif dengan menimbulkan adanya pencemaran lingkungan, dimana pada kondisi lingkungan yang

tercemar akan mengakibatkan timbulnya penyakit terhadap makhluk hidup yang hidup di area tersebut baik pada tumbuhan, hewan, ataupun manusia.

Pencemaran lingkungan yang ditimbulkan oleh aktivitas pertambangan minyak berupa kontaminasi logam berat pada tanah dan air, dimana kedua unsur ini merupakan komponen utama yang dibutuhkan oleh makhluk hidup. Kontaminasi logam berat hasil pengolahan pertambangan minyak dapat berupa nikel (Ni), tembaga (Cu), cadmium (Cd), besi (Fe), arsenic (As), timbal (Pb), seng (Zn), merkuri (Hg), kromium (Cr), dan lain-lain. Beberapa jenis logam berat dibutuhkan oleh makhluk hidup untuk menunjang aktivitas sintesis di dalam sel, tetapi hanya dengan kadar tertentu. Seperti jenis logam berat besi (Fe), seng (Zn), tembaga (Cu), dan kromium (Cr). Adanya logam berat yang cukup lama pada lingkungan yang tercemar akan menimbulkan racun. Dimana logam berat secara signifikan akan terakumulasi pada lingkungan kemudian akan masuk kedalam rantai makanan. Pada konsentrasi yang tinggi, logam berat akan menjadi racun dan membahayakan kesehatan manusia (Ahmad, 2018).

Logam berat seng (Zn) yang ditemukan dilingkungan dapat membahayakan kesehatan manusia, dimana logam ini merupakan salah satu logam yang memiliki sifat toksisitas terhadap kesehatan manusia, ketika diatas ambang batas maximal. Menurut *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization* (FAO/WHO) (2001) dalam Kartono (2012) seng sebagai unsur mineral mikro memiliki kebutuhan yang berbeda per hari menurut usianya, pada usia 7-11 bulan bayi membutuhkan 3 mg, pada usia 1-3 tahun membutuhkan 4 mg, usia 4-

6 tahun membutuhkan 5 mg, usia 7-9 tahun membutuhkan 11 mg, sedangkan pada orang dewasa perempuan membutuhkan 10 mg, dan pada laki-laki dewasa membutuhkan 13 mg. Ketika logam ini ditemukan dengan kadar sedikit di lingkungan juga mampu terakumulasi ke dalam rantai makanan melalui penyerapan ion logam pada tumbuhan ketika proses absorpsi. Nilai maksimal kadar logam seng (Zn) dalam tanah tercemar menurut *Ambient Multimedia Environment Goal* (AMEG) dalam Notodarmojo (2005) sebesar 4,0 mg/kg. Pada uji pendahuluan yang sudah dilakukan oleh peneliti di pertambangan minyak Wonocolo mengandung logam berat seng (Zn) berkisar 11,56-18,20 mg/kg, dapat diketahui bahwa kandungan seng (Zn) pada tanah pertambangan minyak di Wonocolo melebihi batas maksimal aman yang telah ditentukan oleh *Ambient Multimedia Environment Goal* (AMEG).

Seng (Zn) termasuk dalam bahan kimia golongan logam berat yang dibutuhkan oleh tubuh manusia untuk proses metabolisme, tetapi jika kadar seng dalam tubuh terlalu banyak maka akan bersifat racun dan dapat menyebabkan beberapa jenis penyakit yaitu meliputi demam logam-asap dalam jangka pendek, kemudian gangguan pada sistem pencernaan (Abbas, 2014). Kontaminasi logam berat di lingkungan seperti yang terjadi di pertambangan Wonocolo membuat lingkungan tidak seimbang. Kerusakan yang telah terjadi di lingkungan karena ulah tangan manusia telah dijelaskan beberapa abad lalu oleh Allah SWT dalam Al-Quran surah Ar-Rum ayat 41:

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ

Artinya: " *Telah nampak kerusakan di darat dan di laut disebabkan karena perbuatan tangan manusia, supaya Allah merasakan kepada mereka sebahagian dari (akibat) perbuatan mereka, agar mereka kembali (ke jalan yang benar).*" (QS. Ar-Rum 30: Ayat 41).

Kata *الْفَسَادُ* dalam ayat di atas berarti "*kerusakan*". Menurut tafsir al Mishbah, kata *al-fasad* adalah *keluarnya sesuatu dari keseimbangan, baik sedikit maupun banyak*. Kata keseimbangan ini dapat digunakan untuk menunjukkan pada keseimbangan lingkungan, yaitu suatu keadaan dimana interaksi antar biotik dan abiotik tidak berjalan dengan lancar (Shihab, 2002). Hal ini terjadi pada lingkungan tercemar di daerah pertambangan minyak di Desa Wonocolo yang terkontaminasi oleh logam berat seng (Zn). Untuk mengurangi kadar cemaran seng (Zn) pada lingkungan perlu dilakukan upaya bioremediasi.

Bioremediasi merupakan usaha untuk mengurangi efek negatif dari industri yang menghasilkan limbah/polusi logam berat dengan bantuan makhluk hidup. Salah satu makhluk hidup yang menjadi agen bioremediasi adalah cendawan (mikoremediasi). Mikoremediasi berasal dari miko-bioremediasi yang berarti menggunakan cendawan untuk menghilangkan senyawa yang bersifat toksik dari air, lumpur dan tanah sehingga lingkungan kembali menjadi bersih dan kembali alamiah. Mikoremediasi dapat dilakukan dengan biostimulasi yang sudah ada di dalam tanah yang tercemar dengan cara memberikan lingkungan pertumbuhan yang diperlukan dan bioaugmentasi (Ahmad, 2018).

Agen biologis mikoremediasi dapat diperoleh dengan mengisolasi fungi endofit dari organ tanaman yang toleran di lingkungan tercemar tersebut. Fungi endofit

merupakan jamur yang hidup didalam jaringan tumbuhan namun tidak memberikan efek negatif pada proses metabolisme tumbuhan tersebut. Salah satu tanaman yang memiliki kemampuan untuk mengakumulasi logam berat dan banyak ditemukan pada pertambangan minyak Wonocolo yaitu tanaman Gletang (*Tridax procumbens*). Gletang (*Tridax procumbens*) mampu mengakumulasi logam seng (Zn) sebanyak 293 ppm (Raghu, 2001).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Govarthan (2016) bakteri endofit *Tridax procumbens* mampu mengakumulasi logam seng (Zn) 250-750 ppm dengan konsentrasi logam berat 100-750 mg/l. Mikroorganisme endofit yang hidup pada akar *Tridax procumbens* sebagai tanaman hiperakumulator tanah tercemar logam berat, dapat membantu dalam pertahanan dan pertumbuhan tanaman. Bagaimanapun fungi endofit yang terdapat di akar *Tridax procumbens* berpotensi juga sebagai agen mikoremediasi logam berat jenis seng (Zn).

Allah SWT telah berfirman dalam Al-Quran Surat An-Nahl ayat 13 yaitu:

وَمَا ذَرَأْنَا لَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَذَكَّرُونَ

Artinya: “dan Dia (menundukkan pula) apa yang Dia ciptakan untuk kamu di bumi ini dengan berlain-lainan macamnya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran”.

Dari ayat di atas dapat diketahui bahwa Allah SWT dalam penciptaan makhluknya memiliki ciri yang berbeda antar spesies, baik dari segi bentuk maupun warnanya. Di mana hal ini yang nantinya akan digunakan untuk identifikasi spesies fungi endofit dengan melihat ciri khas pada materi genetik setiap spesies. Pentingnya

identifikasi molekuler yaitu untuk mendapatkan hasil yg akurat pada spesies fungi endofit.

Identifikasi molekuler dapat menggunakan karakter pengenalan daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosom. Menurut Nugroho (2013) metode ini merupakan metode yang menggunakan sekuen DNA ribosomal (rDNA) pada daerah ITS. Vicente (2005) menjelaskan bahwa penggunaan DNA ribosomal untuk identifikasi suatu organisme memiliki beberapa syarat yaitu, sifat homolog pada berbagai organisme yang berbeda, terdapat banyak di dalam sel, dan sekuennya berkisar 500-800 bp, sehingga memungkinkan dilakukan uji statistik untuk melihat perbedaan spesies satu dengan yang lain.

Daerah ITS merupakan daerah dengan memiliki variasi sekuen tinggi. Hal ini dikarenakan pada daerah ini memiliki basa nitrogen yang berpasangan sebanyak lebih kurang 700 pasang dan memiliki salinan yang banyak di dalam genom intinya, sehingga banyak peneliti menggunakan daerah ITS ini untuk proses isolasi, amplifikasi, dan analisis (Hidayat, 2008). Primer yang sering digunakan oleh peneliti untuk mengidentifikasi fungi bahkan hingga ke tingkatan spesies yaitu primer ITS1 (*forward*) dan ITS4 (*reverse*). Primer ITS 1 dan ITS4 akan mengamplifikasi daerah ITS rDNA yang didalamnya terdapat struktur sekuen yang konservatif dan dapat ditemukan dalam jumlah yang banyak (Legiastuti, 2012).

Berdasarkan penjelasan diatas diketahui penelitian mengetahui spesies fungi endofit dari akar tanaman *Tridax procumbens* yang mempunyai kemampuan toleransi teradap logam berat seng (Zn). Penelitian ini difokuskan pada uji kemampuan dari

jamur endofit yang memiliki kemungkinan mampu toleran terhadap logam seng (Zn) untuk kemudian diketahui spesies fungi endofitnya.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan penjabaran latar belakang diatas, maka peneliti menjabarkan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kemampuan toleransi logam Zn isolat fungi endofit dari akar Gletang (*Tridax procumbens*) di tanah pertambangan minyak Desa Wonocolo Kabupaten Bojonegoro, Jawa Timur?
2. Apa spesies isolat fungi endofit dari akar Gletang (*Tridax procumbens*) yang mampu toleran terhadap logam Zn?

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk:

1. Mengetahui kemampuan toleransi logam Zn isolat fungi endofit dari akar Gletang (*Tridax procumbens*) di tanah pertambangan minyak Desa Wonocolo Kabupaten Bojonegoro, Jawa Timur.
2. Mengetahui spesies isolat fungi endofit dari akar Gletang (*Tridax procumbens*) yang mampu toleran terhadap logam Zn..

1.4. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu:

1. Terdapat beberapa isolat fungi endofit dari akar Gletang (*Tridax procumbens*) yang mampu toleran terhadap logam Zn.
2. Terdapat isolat fungi endofit dari akar Gletang (*Tridax procumbens*) dengan jenis spesies yang berbeda.

1.5. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk:

1. Memberikan informasi kepada pembaca akan adanya spesies fungi endofit sebagai agen mikoremediasi.
2. Memperbanyak pengetahuan di bidang mikrobiologi atau bidang lainnya, khususnya jamur endofit yang mampu toleran terhadap logam Zn.

1.6. Batasan Masalah Penelitian

Untuk mendapatkan penelitian yang lebih terarah, maka peneliti memiliki batasan masalah sebagai berikut:

1. Fungi endofit yang digunakan dalam penelitian ini merupakan 11 isolat fungi dari akar Gletang (*Tridax procumbens*) yang diperoleh dari pertambangan minyak di Desa Wonocolo, Kabupaten Bojonegara, Jawa Timur koleksi isolat

di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

2. Uji ketahanan fungi dilakukan dengan konsentrasi ZnCl_2 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ppm.
3. Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah nilai toleran index (Ti)
4. Isolat yang memiliki nilai toleran index (Ti) tertinggi kemudian diidentifikasi secara morfologi dan molekuler.
5. Primer yang digunakan adalah ITS1 (*forward*) dan ITS4 (*reverse*).
6. Data *sequence* DNA dianalisis tingkat kesamaannya dengan data yang sudah tersedia di web server BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Gletang (*Tridax procumbens*)

2.1.1. Klasifikasi Gletang (*Tridax procumbens*)

Tumbuhan Gletang (*Tridax procumbens*) memiliki klasifikasi sebagai berikut (Ankita, 2012):

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Divisi: Magnoliophyta

Kelas: Magnoliopsida

Subkelas: Asterales

Ordo: Asterales

Family: Asteraceae

Genus: *Tridax*

Spesies: *Tridax procumbens*

2.1.2. Morfologi Gletang (*Tridax procumbens*)

Tumbuhan Gletang (*Tridax procumbens*) merupakan salah satu tanaman golongan herba yang memiliki bentuk morfologi pada bagian akarnya serabut, batang silindris berwarna coklat serta bercabang, daun bulat telur dan berwarna hijau, daun berhadapan, tepi daun bergerigi, dan memiliki bunga berbentuk tabung dengan

mahkota berwarna putih (Gambar 2.1). Tanaman ini mampu mencapai ketinggian 30-50cm dari permukaan tanah (Ankita, 2012).



Gambar 2.1. Tumbuhan Gletang (*Tridax procumbens*) (Ankita, 2012).

2.1.3. Toleransi Gletang (*Tridax procumbens*) Terhadap Logam Berat

Allah SWT berfirman dalam Al-Quran surah Luqman ayat 10 yang berbunyi:

خَلَقَ السَّمَاوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۖ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ

Artinya: Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan Dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. Dan Kami turunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik.

Menurut tafsir Al-Mukhtashar kalimat وَأَنزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ bermaksud bahwa Allah SWT telah menurunkan hujan dari langit, kemudian dari air hujan tersebut tumbuhlah berbagai macam tumbuhan yang baik. Tumbuhan yang memiliki warna dan dapat bermanfaat bagi manusia dan binatang di bumi. Tak terkecuali seperti pada tumbuhan *Tridax procumbens* yang memiliki sifat toleran

terhadap lingkungan yang tercemar limbah pertambangan sehingga dapat menjadi salah satu agen bioremediasi logam berat.

Tridax procumbens merupakan salah satu tanaman hiperakumulator, dimana tumbuhan ini mampu mengakumulasi logam berat hingga 1000 ppm, menurut Aishwarya (2014) tumbuhan hiperakumulator adalah tumbuhan yang dapat menyerap logam berat mencapai 1% pada logam seng; 0.1% untuk logam jenis timbal, kobalt, nikel, tembaga; dan 0.01% pada logam cadmium. Pada penelitian Raghu (2001) *Tridax procumbens* mampu mengakumulasi beberapa jenis logam berat yang ditemukan pada tanah tercemar pertambangan minyak di India, logam berat tersebut meliputi logam zing 2301 ppm, tembaga 1158 ppm, barium 360 ppm, magnesium 217 ppm, strontium 202 ppm, litium 158 ppm, timbal 104 ppm.

Tumbuhan yang hidup pada habitat tanah normal akan memiliki resistensi terhadap logam berat yang rendah dibandingkan dengan tumbuhan yang hidup pada habitat yang tercemar. Logam berat akan tertinggal di tanah dan masuk ke dalam jaringan tanaman ketika logam berat tersebut tidak dapat terdegradasi secara sempurna (Sani, 2017).

2.2. Logam Seng (Zn)

Logam berat Seng memiliki nama kimia Zink dan ber lambangkan Zn. Logam berat Zn memiliki nomor atom 30, konfigurasi elektron $[Ar]3d^{10}4s^2$, terdapat pada golongan IIB unsur transisi dalam tabel periodik, dan memiliki berat atom 65,39. Zn

melebur pada suhu 410°C dan mendidih pada suhu 906°C (Palar, 1994 dalam Al-Harisi, 2008). Pada suhu tinggi Zn akan mengendap seperti pasir. Zn diperlukan tubuh untuk proses metabolisme yaitu sebagai koenzim, tetapi dalam kadar tinggi dapat bersifat menjadi *toxic* (Slamet, 1994 dalam Al-Harisi, 2008).

Seng (Zn) berwarna biru putih dan berkilau. Logam ini banyak ditemukan di kulit bumi yaitu terdapat dalam tanah, air, dan udara, sehingga memungkinkan terjadinya pencemaran logam seng. Logam seng (Zn) ditemukan di daerah-daerah dekat industri, pertambangan, pembakaran batu bara dan limbah-limbah pembakaran serta pabrik baja. Seng banyak digunakan untuk membuat baterai elektrik, uang logam, pembuatan plastik, kosmetik, kertas fotografi, tinta printer dan lain-lain, namun seng merupakan salah satu unsur esensial yang dibutuhkan dalam tubuh manusia yaitu pada pertumbuhan dan perkembangan tubuh manusia (Sembel, 2015).

2.2.1. Seng Dalam Lingkungan

Allah SWT telah berfirman dalam Al-Quran pada surah Ar-Rad (13) ayat 17 yang berbunyi:

أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَسَالَتْ أَوْدِيَهُ بِقَدَرِهَا فَاحْتَمَلَ السَّيْلُ زَبَدًا رَابِيًا وَمِمَّا يُوقِدُونَ عَلَيْهِ فِي النَّارِ ابْتِغَاءَ حُلْيَةٍ أَوْ مَتَاعٍ زَبَدٌ مِثْلَهُ كَذَلِكَ يَضْرِبُ اللَّهُ الْحَقَّ وَالْبَاطِلَ فَأَمَّا الزَّبَدُ فَيَذْهَبُ جُفَاءً وَأَمَّا مَا يَنْفَعُ النَّاسَ فَيَمْكُثُ فِي الْأَرْضِ كَذَلِكَ يَضْرِبُ اللَّهُ الْأَمْثَالَ

Artinya: Allah telah menurunkan air (hujan) dari langit, maka mengalirlah ia (air) di lembah-lembah menurut ukurannya, maka arus itu membawa buih yang mengambang. Dan dari (logam) yang mereka lebur dalam api (pula) buihnya

seperti (buih arus) itu. Demikianlah Allah membuat perumpamaan tentang yang benar dan yang batil. Adapun buih, akan hilang sebagai sesuatu yang tidak ada gunanya, tetapi yang bermanfaat bagi manusia, akan tetap ada di bumi. Demikianlah Allahh membuat perumpamaan.

Menurut Tafsir Min Fathil Qadir pada ayat diatas memiliki makna yaitu Allah menciptakan logam yang memiliki dua kemungkinan, yaitu ada beberapa logam seperti emas, besi, dan perak yang dibakar kemudian dimanfaatkan oleh manusia menjadi sebuah perhiasan ataupun bejana, namun dari logam tersebut memiliki buih yang berupa kotoran dari logam-logam yang dipanaskan. Sehingga kotoran logam dapat mencemari lingkungan yang mengakibatkan alam menjadi tidak seimbang. Sama halnya pada kontaminasi logam Zn di tanah pertambangan minyak Wonocolo saat ini, yang dapat mengakibatkan pencemaran lingkungan dan mengganggu kelangsungan mahluk hidup di sekitarnya.

Logam Seng (Zn) adalah logam yang memiliki karakteristik cukup reaktif. Zn dapat bereaksi dengan asam, basa dan senyawa non logam, hal ini dapat mempengaruhi kadar konsentrasi logam pada substrat. Seng (Zn) dapat ditemukan dalam keadaan bebas, tetapi dalam bentuk terikat bersama unsur lain berupa mineral. Mineral yang mengandung seng (Zn) di alam bebas antara lain kalaminit, franklinite, smithsonite, willemite, dan zinkit. Seng (Zn) mampu memberikan dampak negatif dengan menimbulkan berbagai permasalahan yang cukup serius pada perairan dan kesehatan. Penyebab terjadinya biasanya berasal dari masukan air yang terkontaminasi oleh limbah buangan industri atau pertambangan. (Widowati et al, 2008).

Bahan tambang adalah sumber utama dari pencemaran seng pada lingkungan. Limbah pabrik dari seng dapat masuk ke dalam air tanah dan sungai, sehingga mengakibatkan pencemaran air sungai yang dapat meresap masuk ke dalam tanah melebihi standar. Hal ini mengakibatkan terganggunya kemampuan tanaman untuk mengabsorpsi logam-logam esensial lainnya (Sembel, 2015).

Air minum, air sungai, air sumur dan kolam serta tanah yang terdapat di lokasi dimana terdapat pabrik-pabrik yang memiliki limbah mengandung seng tinggi biasanya sudah tercemar oleh seng terutama bila air limbah buangan pabrik ini tidak dipurifikasi dengan baik. Terdapat beberapa jenis ikan yang dapat mengakumulasi seng dalam tubuh dan melalui siklus jaringan makanan yang lama-kelamaan terakumulasi dalam ikan dan pada akhirnya masuk ke dalam tingkatan trofik yang lebih tinggi di antaranya manusia yang makan ikan yang sudah terkontaminasi seng. Seng juga dapat terakumulasi dalam tanah dan dapat mengganggu kesehatan hewan ternak dan tanaman kehidupan mikroorganisme tanah (Sembel, 2015).

2.2.2. Toksikologi Logam Zn

Seng adalah logam yang juga merupakan mineral penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tubuh manusia. Tubuh manusia membutuhkan seng untuk dapat berfungsi secara baik dan kebutuhan seng ini dapat dipenuhi manusia melalui sayuran dan atau makanan multivitamin, kekurangan seng dalam tubuh dapat mengakibatkan seseorang kehilangan nafsu makan dan penciuman. Namun campuran logam ini dapat menjadi bahan yang sangat beracun bila terkontaminasi oleh manusia atau hewan

meskipun bila dalam bentuk kombinasi seng dengan mineral-mineral cukup aman. Ion seng yang berada dalam bentuk larutan sangat beracun bagi tumbuhan serta hewan-hewan invertebrata dan vertebrata terutama ikan (Sembel, 2015).

Administrasi makanan and obat (*Food and Drug Administration*) (FDA) menyatakan bahwa seng dapat merusak reseptor saraf dalam hidung dan menyebabkan terjadinya *anosmia* atau kehilangan kemampuan membaui, baik secara permanen atau temporer dan hal ini dapat membahayakan karena penderita *anosmia* tidak dapat membedakan makanan yang segar dengan yang sudah membusuk. Seng dapat membahayakan kesehatan manusia bila dikonsumsi melebihi standar yang dibutuhkan oleh tubuh manusia. Apabila mengonsumsi seng terlalu berlebihan akan merusak pankreas dan mengganggu metabolisme protein dan mengakibatkan penyakit yang disebut *arteriosklerosis*. *Arteriosklerosis* adalah suatu keadaan yang ditandai dengan hilangnya elastisitas dari arteri atau terjadi pengerasan arteri karena penebalan dinding pembuluh nadi yang dapat menyebabkan penyakit jantung *degenerative*, *stroke*, dan penyakit arteri lainnya. Eksposur yang tinggi terhadap seng klorida dapat mengakibatkan penyakit pernapasan. Seng juga dapat berbahaya bagi bayi yang dilahirkan oleh ibu yang mengonsumsi susu yang memiliki kandungan seng yang tinggi. Mengonsumsi seng secara berlebihan melalui minuman kaleng dapat mengganggu pencemaran makanan dan mengakibatkan diare (Sembel, 2015).

2.3. Deskripsi Fungi

Fungi dalam bahasa latin juga berarti jamur. Fungi sudah lama dikenal manusia, bahkan sudah dimanfaatkan sebagai penyedap minuman fermentasi. Fungi makroskopis yang mempunyai tubuh besar, yang sekarang dikenal sebagai makrofungi, sedangkan mikrofungi baru ditemukan oleh Pier Antonio Micheli, seorang ahli botani Italia, pada tahun 1729 menerbitkan hasil penelitiannya mengenai sains mikologi. Dulu fungi masuk ke dalam kingdom plantae, tetapi sekarang fungi berdiri sebagai regnu tersendiri. Ciri-ciri organisme yang dikelompokkan ke dalam kingdom Fungi adalah (Gandjar, 2006):

1. Eukariotik
2. Tidak berklorofil
3. Tumbuh sebagai hifa atau sebagai sel khamir
4. Memiliki dinding sel yang mengandung kitin, bersifat heterotrof
5. Menyerap nutrien melalui dinding selnya dan mengeksresikan enzim-enzim ekstraseluler ke lingkungan
6. Menghasilkan spora atau konidia
7. Melakukan reproduksi seksual dan/atau aseksual

Di alam fungi sering dijumpai pada daerah lembab, misalnya pada substrat serasah, atau pada buah-buah yang mulai membusuk, atau pada batang koloni suatu fungi, yaitu berupa benang-benang putih halus sekali yang membentuk suatu jala atau

berupa bercak-bercak dengan warna indah yang cerah (hijau, jingga, biru, dll). Pada tempat yang kurang sinar matahari fungi juga dapat ditemukan, apabila tercium bau apek atau bau alkohol, atau bau harum senyawa ester yang merupakan hasil metabolisme dari fungi (Gandjar, 2006).

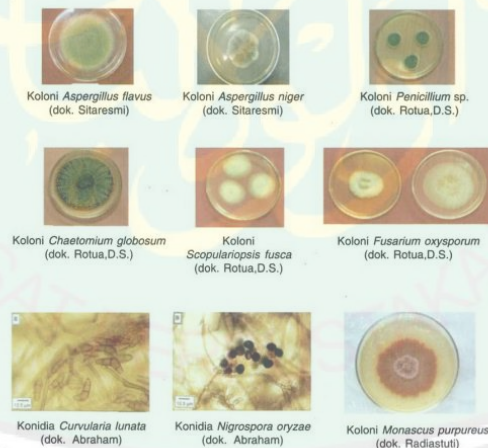
Jumlah spesies fungi yang sudah diketahui hingga kini adalah kurang lebih 69.000 dari perkiraan 1.500.000 spesies yang ada di dunia, dan menurut Rifai (1995) dalam Gandjar (2006). Di Indonesia terdapat kurang lebih 200.000 spesies. Dapat dibuktikan bahwa Indonesia salah satu negara yang memiliki kekayaan diversitas hewani dan hayati, tak terkecuali juga pada diversitas fungi yang sangat tinggi, dikarenakan Indonesia memiliki iklim tropik dengan lingkungan yang lembab dan hangat, dimana lingkungan seperti itu mampu mendukung pertumbuhan dan perkembangan fungi.

Mueller, *et al.* (2004) dan Alexopoulos, *et al.* (1996) dalam Gandjar (2006) membagi fungi dalam kelompok berikut:

1. Ascomycota, kelompok ini merupakan kelompok terbesar yang meliputi 3.250 genera dan mencakup 32.250 spesies dengan sebagian besar mikrofungi.
2. Deuteromycota, kelompok ini juga disebut fungi anamorf, fungi imperfekti, fungi konidial, fungi mitosporik atau fungi aseksual dan mencakup 2.600 gener dan 15.000 spesies. Deuteromycota bukan merupakan kategori taksonomi formal. Kapang-kapang tersebut merupakan suatu unit monofiletik, tetapi mereka adalah fungi yang “kehilangan” fase seksualnya. Dengan

menggunakan teknik molekular atau teknik ultrastruktur kapang-kapang tersebut dapat dimasukkan ke dalam kelas-kelas yang ada.

3. Basidiomycota, kelompok ini meliputi 1.400 genera dan 22.250 spesies. Sebagian besar adalah basidiomycota mikroskopis. Sebagian besar makrofungi yang terkenal adalah Basidiomycota dan hanya sedikit dari makrofungi yang termasuk Ascomycota.
4. Zygomycota, kelompok ini mencakup 56 genera dan kurang lebih 300 spesies, kelompok ini memiliki septa dalam hifanya.
5. Chytridiomycota, kelompok ini mencakup 112 genera dan 793 spesies dengan banyak terkenal fungi akuatik.



Gambar 2.2. Beberapa fungi tropik yang umum ditemukan (Gandjar, 2006)

2.3.1. Keuntungan dan Kerugian Fungi

Jamur ada yang berguna, ada yang tidak berguna. Jamur tidak memiliki klorofil, makan untuk kelangsungan kehidupan bergantung pada zat-zat yang sudah jadi yang dibuat oleh organisme lain disebut organisme heterotrof. Kalau zat organik yang diperlukan jamur itu zat yang sudah tidak diperlukan pemiliknya lagi maka jamur seperti itu disebut saprofit. Disamping jamur saprofit dikenal juga jamur parasit dan jamur patogen. Banyak jamur pada tumbuhan, hewan, dan manusia. Fitopatologi (ilmu penyakit tumbuhan) khusus membicarakan penyakit tumbuhan yang disebabkan oleh jamur. Mikosis adalah istilah umum untuk penyakit yang disebabkan jamur sebaliknya jamur yang menguntungkan banyak juga, jamur yang enak dimakan jamur merang, jamur kuping, jamur padi. Tanpa jamur orang tidak dapat membuat roti, minuman beralkohol seperti anggur, tape, tempe, oncom, tauco dan berbagai asam organik. Antibiotik pertama penisilin yang berasal dari jamur *penicillium*. Dari genus *Aspergillus* diperoleh antibiotik seperti fumigatin dan *sspergilin*. Dari genus *Fusarium* diperoleh fusanin dan javasinin (Dwidjoseputro, 1978).

Menurut Iram (2009) fungi selain dapat digunakan pada bidang pangan dan kesehatan, fungi juga mampu menjadi salah satu agen bioremediasi logam berat pada lingkungan. Pada fungi genus *Aspergillus*, *Penicillium* dan *Fusarium* mampu toleran terhadap tanah pertanian yang tercemar logam berat (Zn, Pb, Cd, Ni, dan Co). Menurut Siddiquee et al (2013) jamur *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma virens* mampu meremediasi logam berat Pb, Cu, Ni, dan Zn. Pada penelitian Kumar

(2012), Ahmad (2005), dan Akhtar (2013) jamur genus *Aspergillus* mampu meremediasi logam berat Zn, Cr, Cu, Ni, dan Cd.

2.3.2. Fungi Endofit

Fungi endofit merupakan fungi yang ditemukan didalam sistem jaringan tumbuhan baik itu pada organ daun, bunga, akar, dan ranting tumbuhan. Fungi endofit menginfeksi tumbuhan sehat pada jaringan tertentu dan mampu menghasilkan mikotoksin, antibiotik, dan enzim (Carrol, 1998 dalam Worang, 2003). Sedangkan menurut Tan (2001) menyatakan bahwa pada setiap tumbuhan tingkat tinggi mengandung beberapa mikroba endofit yang dapat menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang disebabkan oleh koevolusi atau transfer genetik dari tanaman inangnya di dalam mikroba endofit.

Kehadiran fungi endofit dalam jaringan makhluk hidup memiliki pengaruh penting dalam ekosistem dimana fungi endofit dapat menopang ketahanan tumbuhan inangnya terhadap lingkungan sekitar baik secara biotik maupun abiotik. Pengetahuan mengenai asosiasi fungi endofit dengan tanaman inangnya belum tereksplor secara menyeluruh. Memahami dan mengeksplorasi asosiasi fungi endofit dengan tanaman inangnya tersebut dapat memfasilitasi produksi ideal kandungan metabolit sekunder tanaman yang lebih baik dengan memanipulasi kondisi pertumbuhan tanaman inangnya, misalnya menambahkan kelompok fungi endofit tertentu untuk

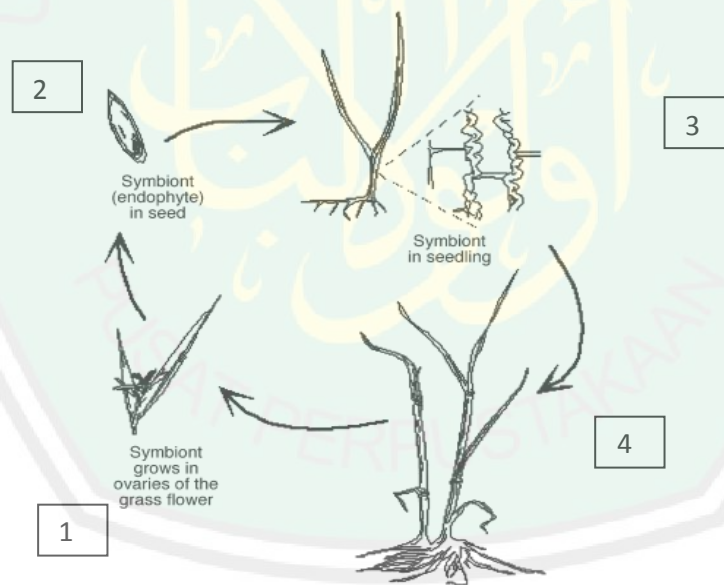
meningkatkan ketahanan dan akumulasi logam berat pada daerah tercemar di tanah pertambangan.

2.3.3. Asosiasi Fungi Endofit dengan Tanaman Inangnya

Asosiasi fungi endofit dalam tumbuhan inangnya menurut Carrol (1988) dalam Worang (2003) terbagi menjadi dua kelompok, yaitu asosiasi mutualisme konstitutif dan induktif. Mutualisme konstitutif merupakan asosiasi yang erat antara fungi dengan tumbuhan terutama pada jenis tanaman rendah. Fungi endofit menginfeksi benih inang, dan penyebarannya melalui benih serta organ penyerbukan inang. Sedangkan pada simbiosis mutualisme induktif terjadi antara fungi endofit dengan tanaman inangnya, dimana penyebarannya terjadi secara bebas dapat melalui air, udara, maupun tanah. Pada asosiasi jenis ini hanya akan menginfeksi bagian organ vegetatif inangnya dan seringkali ada dalam keadaan organisme tersebut pada fase metabolisme inaktif dengan jangka waktu yang cukup lama.

Fungi endofit bisa hidup dalam jaringan dalam jangka waktu tertentu. Pada setiap tanaman tingkat tinggi dapat terinfeksi fungi endofit yang membentuk koloni. Fungi endofit bisa menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya. Hal ini disebabkan karena adanya transfer genetik antara fungi endofit dengan tanaman inangnya (Radji, 2005).

Penyebaran koloni endofit pada jaringan tanaman bisa melalui beberapa mekanisme, salah satunya yaitu spora melalui udara (*airborne*) dimana penyebaran inokulum terjadi melalui udara dengan cara spora terbang dengan angin dan jatuh pada permukaan tanaman, kemudian spora akan tumbuh dan menginfeksi jaringan tanaman sampai di antara sel, penyebaran ini dinamakan penyebaran horizontal yang banyak terjadi pada tanaman jenis rumput-rumputan. Sedangkan penyebaran vertikal terjadi pada tanaman dengan menginfeksi pada organ biji dan menetap, kemudian menyebar dan tumbuh bersama perkecambahan biji dan tinggal pada tanaman keturunannya begitu secara terus menerus (Agusta, 2009).



Gambar 2.3. Simbiosis Mikroba endofit dengan tanaman inangnya. 1. Simbiosis fungi endofit pada biji tanaman, dimulai dengan proses adaptasi. 2-3. Simbiosis mikroba endofit berlangsung dari proses persemaian hingga tanaman mengalami kematian. 4. selain pada biji tanamannya, fungi endofit juga mampu bersimbiosis pada ovari bunga pada tanaman inang (Tan dan Zouu, 2001).

2.4. Toleransi Fungi Terhadap Logam Berat

2.4.1. Interaksi Fungi dengan Logam Berat

Interaksi logam berat dengan fungi telah lama menjadi salah satu organisme yang mengalami toksisitas di lingkungan, sedangkan pencemaran lingkungan di alam berkembang semakin cepat karena pencemaran logam berat yang semakin hari bertambah. Translokasi logam berat dan radionuklida yang ada pada buah tanaman di lingkungan tercemar lebih tinggi dan berbahaya untuk manusia, untuk mengurangi toksisitas logam berat dan radionuklida dapat dilakukan dengan menggunakan biomassa fungi sebagai agen potensi bioteknologi masa depan (Gadd, 1993).

Logam berat dapat memberikan efek berbahaya dalam banyak hal meskipun mekanisme utama toksisitas seringkali merupakan hasil dari kemampuan koordinasi yang kuat. Efek toksik termasuk pemblokiran kelompok fungsional molekul yang penting secara biologis misalnya enzim, dan sistem transportasi untuk nutrisi dan ion esensial, perpindahan dan/ atau penggantian ion logam esensial dari biomolekul dan unit seluler fungsional, konformasi modifikasi, denaturasi dan inaktivasi enzim dan gangguan sel dan organel integritas membran. Karena spektrum yang luas logam berat berpotensi toksik terhadap jamur, hampir setiap aspek metabolisme, pertumbuhan dan diferensiasi dapat dipengaruhi, tergantung pada organisme, spesies logam dan konsentrasi dan faktor-faktor fisikokimia (Gadd, 1993).

Logam organik umumnya lebih toksik terhadap jamur daripada logam anorganik yang sesuai spesies dan toksisitas senyawa logam organik bervariasi dengan jumlah dan identitas kelompok organik. Efek utama dari organotin dan organolead adalah gangguan plasma dan membrane mitokondria dan tindakan sebagai Cl^+/OH^- ionofor mendepolarisasi gradien elektrokimia (Gadd, 1993).

Kelangsungan hidup jamur terutama tergantung pada sifat biokimia dan struktural intrinsik, adaptasi fisiologis dan genetik, termasuk perubahan morfologis, dan modifikasi lingkungan spesiasi logam, ketersediaan dan toksisitas (Gadd, 1993). Mungkin lebih tepat untuk mendefinisikan "resistensi logam" sebagai kemampuan suatu organisme untuk bertahan hidup dari toksisitas logam melalui mekanisme yang dihasilkan sebagai tanggapan langsung terhadap spesies logam yang disimpulkan, misalnya *metallothionein* atau *y-glutamyl peptide* sintesis (Mehra dan Winge, 1991).

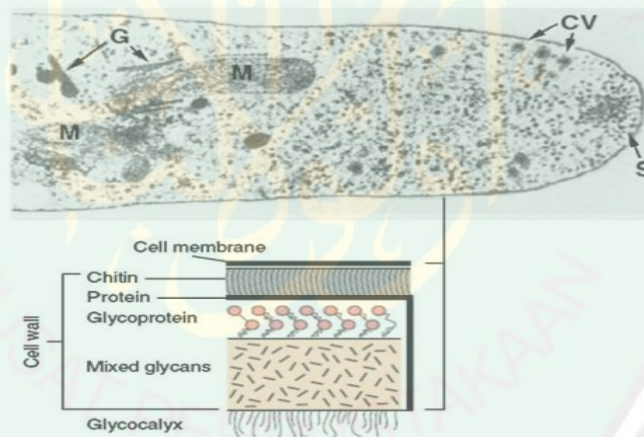
Sifat intrinsik yang dapat ditentukan kelangsungan hidup termasuk kepemilikan dinding sel berpigmen kedap air, ekstraseluler polisakarida, dan ekskresi metabolit, terutama di mana ini mengarah pada detoksifikasi logam berat misalnya mengikat atau presipitasi. Namun, banyak yang sulit dibedakan karena keterlibatan beberapa fisikokimia langsung dan tidak langsung dan mekanisme biologis dalam bertahan hidup. Mekanisme biologis terlibat dalam kelangsungan hidup jamur (berbeda dari modifikasi toksisitas lingkungan) termasuk presipitasi ekstraseluler, kompleksasi dan kristalisasi, transformasi spesies logam, misalnya oksidasi, reduksi, metilasi dan

dealkilasi, biosorpsi ke dinding sel, pigmen dan ekstraseluler (Mehra dan Winge, 1991).

2.4.2. Toleransi Fungi

Secara umum terdapat dua mekanisme toleransi logam berat pada fungi, yaitu meliputi (Anahid, 2011):

1. Ekstraseluler (dinding sel). Mekanisme ekstraseluler terutama tersirat dalam penghindaran masuknya logam. Molekul organik berbeda yang melakukannya bukan dari matriks dinding sel dieksresikan oleh sel jamur untuk mengkelat ion logam.



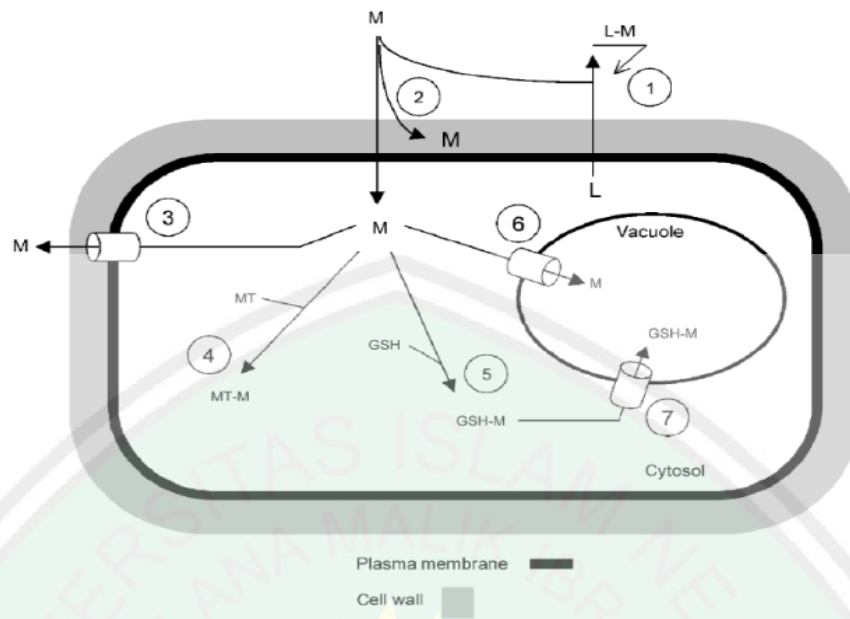
Gambar 2.4. Potongan melintang dinding sel fungi secara umum. S: Daerah pertumbuhan tip, CV: vesikel berlapis, G: aparatus golgi, M: mitokondria (Wang, 2008).

Pengikatan logam berat di dinding sel disebut dengan biosorpsi, permukaan dinding sel fungi bermuatan negatif karena adanya berbagai struktur anionik, seperti glukon dan kitin seperti karboksil (RCOO^-), hidroksil (HO^-), sulfat (SO_4^{2-}), fosfat, dan gugus

amino sehingga memberi kemampuan terhadap jamur untuk mengikat kation logam (gambar 2.4.).

Logam berat akan melewati dinding sel fungi sebagai lapisan pelindung pertama. Dinding sel fungi tersusun atas polisakarida dan protein yang dapat mengikat unsur logam. Beberapa mekanisme logam berat yang dapat diikat oleh dinding sel fungi yaitu, kompleksasi, elektrostatik (mikropresipitasi anorganik), koordinasi, dan pengikatan unsur logam. Unsur logam mampu terikat oleh dinding sel fungi dengan dielusi oleh bantuan ion lain misalnya dengan melalui agen mengkelat (asam) untuk selanjutnya terjadi biosorpsi aktif, yang mengakibatkan ion logam mampu menembus dinding sel dan masuk ke dalam sitosol (Das, 2008).

2. Intraseluler (penyerapan fisik logam) dengan cara mengikat protein atau ligan untuk mencegahnya merusak target seluler sensitif logam. Mekanisme intraseluler bertujuan untuk mengurangi beban logam dalam sitosol. Logam mengangkut protein yang terdapat dalam toleransi ini, baik dengan mengekstraksi racun ion logam dari sitosol keluar dari sel atau dengan membiarkan logam sekuestrasi ke kompartemen vacuolar (gambar 2.5).



Gambar 2.5. Mekanisme seluler toleransi logam pada fungi. M: ion logam, 1. Kelasi ekstraseluler yang diekskresikan melalui ligan (L), 2. Pengikatan dinding sel, 3. Peningkatan efflux, 4. Kelasi intraseluler oleh metallothionein (MT), 5. Kelasi intraseluler oleh glutathione (GSH), 6. Kompartemen subseluler (vakuola atau kompartemen internal lainnya), 7. Kompartemen vakuola oleh GSH-M kompleks (Bellion, 2005).

2.4.3. Mekanisme Fungi Mereduksi Logam Berat

Mekanisme fungi dalam mereduksi logam berat terdapat beberapa cara yaitu meliputi:

1. Biosorpsi, menurut Gavrilescu (2004) merupakan proses penghilangan logam menggunakan bahan biologis. Proses penghilangan logam berat melalui pengikatan pasif ke biomassa nonbiotik dari suatu larutan dan mekanisme reduksinya tidak dikendalikan secara metabolik. Biosorpsi adalah proses penyerapan logam secara pasif oleh sel-sel mikroorganisme, biasanya adalah hasil dari kombinasi antar

penyusun kapsul, dinding sel mikroorganisme, atau polimer ekstraseluler yang disintesis dan diekskresikan oleh mikroorganisme tersebut. Mekanisme biosorpsi dapat dikelompokkan menjadi mekanisme yang bergantung pada metabolisme (*metabolism-dependent mechanisms*) dan mekanisme yang tidak bergantung dengan metabolisme (*metabolism-independent mechanism*) (Pagnanelli *et al.* 2000).

Ion logam berat yang terikat tidak bergantung pada metabolisme (*metabolism-independent metal binding*) dimana logam hanya ada pada dinding sel dan permukaan eksternal dapat terjadi pada mekanisme biosorpsi yang melibatkan biomassa tidak hidup (*non-living biomass*). Sedangkan pada *metabolism-dependent metal binding* terlibat pada proses adsorpsi seperti ionik, kimiawi dan fisika oleh organel fungsional dinding sel biomassa. Biosorben memiliki berbagai sisi fungsional yaitu karboksil, imidazole, sulfidril (thiol), amino, fosfat, sulfat, thioether, fenol, karbonil (keton), amida, gugus hidroksil, fosfonat dan fosfodiester yang memiliki potensi (Gupta dan Mohapatra, 2003; Javanbakht *et al.* 2014). Dinding sel dengan ion logam akan berinteraksi dalam proses biosorpsi yang akan melibatkan makro molekul seperti lipid, protein dan polisakarida yang berada pada permukaan dinding sel fungi (Chipasa, 2003). Biosorpsi adalah proses mikoremediasi paling banyak dilakukan dalam melakukan remediasi.

2. Bioakumulasi, Mikroorganisme memiliki kapasitas untuk mengakumulasi logam berat lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi yang umumnya ada di lingkungan. Proses akumulasi ini dapat dikelompokkan menjadi biokonsentrasi dan

bioakumulasi. Biokonsentrasi merupakan proses peningkatan konsentrasi polutan secara langsung sewaktu berpindah dari lingkungan ke suatu organisme. Sedangkan bioakumulasi adalah absorpsi polutan secara langsung yang terakumulasi melalui nutrisi yang ditambahkan pada organisme (Smical *et al.* 2008). Bioakumulasi logam berat yang dilakukan oleh organisme hidup dapat diartikan sebagai suatu mekanisme dan jalur migrasi polusi dari satu level trofik ke level yang lainnya, termasuk didalamnya melalui rantai makanan suatu organisme sehingga ion logam dapat terakumulasi pada jaringan suatu organ (Kouba *et al.* 2010; Akan *et al.* 2012). Keberadaan logam berat tergantung pada karakteristik bioakumulasi logam yang terkonsentrasi. Bioakumulasi ion logam terjadi secara aktif organisme mengendalikan ion logam secara metabolik dalam selnya. Sedangkan bioavailabilitas logam berat, akumulasi dan toksisitasnya tergantung pada variabel-variabel yang terdapat di lingkungan (Arunakumara dan Zhang 2007).

3. Biopresipitasi, proses reaksi kimiawi terhadap logam berat dilakukan sehingga terbentuk presipitat tidak larut dan kemudian presipitat tersebut dipisahkan melalui proses sedimentasi atau filtrasi (Fu dan Wang 2011). Presipitasi diikuti oleh proses koagulasi atau penggumpalan yang terjadi di dalam pembentukan presipitat hidroksida logam melalui penambahan bahan alkali untuk menghilangkan kation logam berat seperti Pb(II), Cd(II), Cu(II) dan Ni(II) (Dhokal *et al.* 2005). Pada mekanisme biopresipitasi, logam berat tereduksi menjadi presipitat, hal ini dilakukan oleh mikroorganisme pada kondisi anaerob (tidak adanya oksigen) dimana proses ini

berbeda dengan biomineralisasi yang terjadi secara aerob (adanya oksigen) (Martinez *et al.* 2007).

4. Bioreduksi, Pereduksian racun dari suatu lingkungan atau detoksifikasi dengan menggunakan mikroorganisme adalah merupakan pendekatan perlindungan lingkungan yang ramah. Proses bioreduksi yang dilakukan mikroorganisme dapat terjadi secara langsung ataupun tidak langsung. Bioreduksi secara langsung melibatkan aktivitas enzim, sedangkan bioreduksi secara tidak langsung melibatkan produk dari metabolisme (oksidan atau reduktor) dengan melalui reaksi reduksi oksidasi kimiawi (Wani dan Ayoola 2015).

5. *Bioremediation*, yaitu proses pelarutan logam yang berasal dari substrat padat secara langsung bisa dilakukan dengan metabolisme mikroorganisme seperti bakteri dan cendawan, serta secara tidak langsung bisa dilakukan pada produk metabolisme. Unsur-unsur dapat mengalami proses asimilasi, degradasi dan metabolisme senyawa organik serta anorganik seperti C, H, O. Selain itu, pada unsur N terjadi dekomposisi senyawa, denitrifikasi dan nitrifikasi, oksidasi amonia dan nitrit, atau sintesis biopolimer yang mengandung nitrogen (N). Pelapukan, biosorpsi, biopresipitasi dan penyerapan, serta akumulasi pada unsur magnesium (Mg), kalsium (Ca), kobalt (Co), nikel (Ni), seng (Zn) dan kadmium (Cd); reduksi, biosorpsi dan akumulasi perak (Ag); akumulasi, translokasi melalui miselium dan mobilisasi kalium (K) serta natrium (Na); mobilisasi mineral yang mengandung tembaga (Cu); volatilisasi raksa (Hg) menjadi Hg(0), biometilasi Hg dan reduksi Hg(II) menjadi Hg(0); dan peran

lainnya di dalam siklus mineral, termasuk proses dehalorespirasi (Ohimain *et al.* 2009; Gadd 2010).

Mekanisme biosorpsi terutama terjadi di permukaan dinding sel dan permukaan eksternal lainnya pada fungi dengan melalui proses kimiawi dan fisika. Terjadi interaksi yang sangat kuat antara logam dengan permukaan dinding sel. Interaksi ini bisa berupa ikatan ionik, kovalen polar, dan kompleks. Pada mekanisme ikatan antara protein dan polisakarida berfungsi sebagai sumber gugus fungsi dalam mengikat ion logam (Hancock, 1996). Dinding sel fungi yang tersusun atas *carboxyl*, *hidroxyl*, *phosphate*, *phosphodiester*, dan *thiolat*, merupakan gugus yang bermuatan negatif atau berfungsi sebagai anion (Gadd, 1990). Sedangkan chitin sebagai penyusun utama dinding sel fungi tidak bermuatan sehingga chitin akan berikatan dengan ion logam membentuk ikatan kompleks (Tobin, 1994).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksplorasi kualitatif, yaitu dengan cara isolat murni jamur endofit dari akar *Tridax procumbens* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, kemudian mengujikan ketahanan terhadap logam berat seng (Zn) serta mengidentifikasi secara morfologi dan molekuler.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juni 2019. Uji toleransi fungi endofit akar *Tridax procumbens* terhadap logam seng (Zn) bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Isolasi DNA fungi bertempat di Laboratorium Genetika dan Riset Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Adapun analisis kadar logam berat seng (Zn) pada tanah di pertambangan minyak Wonocolo, dengan mengirim sampel ke Balai Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya, dan tahap sekuensing dilakukan dengan mengirim sampel ke BIONEER Korea.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: LAF (*Laminar Air Flow*), *shaker*, *ice box*, mikroskop binokuler, oven, *autoclave*, *hotplate*, neraca analitik, cawan petri, erlenmeyer, tube 1.5 mL, gelas ukur, jarum ose, bunsen, botol flakon, stirer, pinset, objek glass, deck glass, pipet, korek api, plastik ukuran 4 kg, tissue, plastik wrap, aluminum foil, cotton swap, My Cyclyer™ Cyclyer BIO-RAD, mortal steril, waterbath, ultrasentrifugase, tube PCR, thermo Cyclyer, mikropipet, tip, vortex, sentrifugator, nanodrops AE-Nano200 Nucleid Acid Abalyzer versie 2.0, Gel Doc™ XR Imaging System BIO-RAD, Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Centrifuge, freezer, water pass, sisir, cetakan gel, elektroforesis vertical.

3.3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu: 11 isolat murni fungi endofit akar *T. procumbens*, PDA (*Potato Dextrose Agar*), PDB (*Potato Dextrose Borth*), aquades steril, NaCl, Alkohol 70%, ZnCl₂, agarose, TBE 1x. *Loading dye*, PCR MIX, Primer ITS 1 dan ITS 4, buffer 2x CTAB {100mM Tris-HCL (pH 8), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 2% PVP, 0.2% β-mercaptoethanol},

parafilm, *chloroform*, *isoamylalcohol*, *ammonium asetat*, *Nucleus Free Water*, TBE 10x, *ethidium bromide*.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum dilaksanakan penelitian, semua alat dan bahan harus disterilisasi dahulu. Alat-alat yang akan digunakan dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas yang tanpa ada coretan, kemudian dibungkus dengan plastik yang tahan akan suhu panas setelahnya diikat dengan menggunakan karet hingga rapat. Media yang digunakan untuk menumbuhkan jamur dipanaskan hingga mendidih diatas *hotplate*. Media yang sudah dipanaskan disimpan ke dalam tabung erlemeyer, ditutup dengan aluminium foil dan plastik wrab kemudian dimasukkan dalam plastik yang tahan panas. Setelah itu alat dan bahan disterilkan ke dalam autoklaf dengan menggunakan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.2. Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media PDA dan media PDB. Media PDA dan PDB digunakan untuk pemurnian fungi endofit, perlakuan konsentrasi logam Zn terhadap fungi, dan isolasi fungi. Pembuatan media PDA dilakukan dengan mencampurkan 39 gram bubuk media PDA ke dalam 1000 mL aquades. Sedangkan pada media PDB dilakukan dengan cara mencampurkan 29

gram bubuk media PDB ke dalam 1000 mL aquades, kemudian ditambah antibakteri (streptomisin) 200 mg/L⁻¹. PDA dan PDB yang telah dicampur lalu disterilisasi ke dalam *autoclave* selama kurun waktu 15 menit dengan temperatur suhu 121°C dalam tekanan 1 atm. Setelah alarm *autoclave* berbunyi, ditunggu tekanan dan suhu *autoclave* hingga mencapai ke pengaturan awal, media dikeluarkan dari dalam *autoclave* dan ditunggu sampai suhu tidak terlalu panas, media PDA dituangkan pada cawan petri steril dengan kondisi media yang masih hangat, sedangkan media PDB dituang pada pada botol flakon sebelum disterilkan ke dalam *autoclave*. Media disimpan dilemari pendingin.

3.4.3. Peremajaan Isolat Jamur Endofit

Setiap koloni jamur yang tumbuh pada media lama saat disimpan di dalam lemari es dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi media PDA baru, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari hingga menghasilkan isolat fungi yang benar-benar murni tanpa ada kontaminasi fungi lain, untuk selanjutnya dilakukan uji toleransi.

3.4.4. Uji Toleransi Fungi terhadap Logam Zn

Isolat yang telah dimurnikan dengan umur 7 hari diinokulasi ke dalam botol flakon yang berisi media cair PDB dengan konsentrasi logam ZnCl₂ sebesar 0, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ppm. Fungi dimasukkan dengan ukuran cetakan kan sama menggunakan tube seril berwarna biru, masing-masing botol flakon berisikan media 20 ml/3 buah cetakan fungi. Kemudian fungi yang sudah diberi

perlakuan diinkubasi pada suhu ruang selama kurun waktu 7 hari. Dihitung nilai indeks toleransinya dengan menggunakan rumus $Ti = \frac{DW_t}{DW_c} \times 100\%$, nilai Ti tertinggi akan dilanjutkan menuju uji identifikasi (Yan Li, 2011).

Ketengan: Ti: indeks toleransi

DWt: berat kering miselia perlakuan

DWc: berat kering miselia kontrol

3.4.5. Identifikasi Morfologi Isolat Terpilih

3.4.5.1. Identifikasi Makroskopis

Menurut Widowati (2016) identifikasi makroskopis dilakukan dengan mengamati karakter morfologi fungi, dengan beberapa kriteria pengamatan yang meliputi warna dan permukaan koloni (granular, seperti tepung, menggunung, licin), tekstur, zonasi, daerah tumbuh, garis-garis radial dan konsentris, dan warna koloni dari bawah. Hasil pengamatan digunakan untuk identifikasi berdasarkan panduan buku identifikasi *Illustrated Genere of Imperfect Fungi Fourthed* (Barned and Hunter, 2000) dan literatur pendukung lainnya.

3.4.5.2. Identifikasi Mikroskopis

Identifikasi mikroskopis menggunakan metode *slide culture* dengan cara membuat preparat fungi endofit yang terpilih. Mensterilkan satu buah cawan petri, dengan di dalamnya terdapat tissue dan kertas yang dilipat dengan membentuk huruf

V kemudian disterilkan ke dalam *autoclave*, objek glass dan deck glass steril, media PDA padat steril. Media padat PDA steril di potong dengan ukuran 2x2 cm kemudian di pindah ke atas objek glass steril. Ditambah isolat fungi ke media padat dengan menggunakan jarum enten, kemudian di tutup dengan deck glass. Preparat dapat di amati setiap hari hingga hari ke 7 untuk mengetahui perkembangan struktur hifa dan konidia fungi (Rosana, 2014).

3.4.5.3. Identifikasi Molekuler

1. Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan metode CTAB oleh Doyle (1987) dengan modifikasi. Isolasi DNA dimulai dengan diambil miselium fungi endofit yang berumur hari sebanyak 100 mg. Selanjutnya miselium digerus dengan menggunakan mortal steril. Setelah halus, hasil gerusan dipindah pada tube ukuran 2 mL. Ditambahkan 1000 μ l buffer 2X CTAB dan divortex. Kemudian diinkubasi dalam waterbath 65°C selama 60 menit. Selanjutnya ditambah 900 μ l (24:1) *chloroform:isoamilalkohol*. Diinkubasi di suhu ruang selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit. Diambil supernatant, kemudian dipindah pada tube 1.5 mL. Selanjutnya ditambah 1x volume *chloroform:isoamilalkohol* (24:1). Disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit. Diambil supernatant dan dipindah pada tube 1.5 mL. Ditambah isopropanol sebanyak $\frac{2}{3}$ volume supernatan. Didiamkan 1 malam pada suhu -4°C. Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatan,

dan dicuci pellet dengan 500 μ l ethanol absolute. Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 5 menit, dibuang supernatant, dan dikeringkan dalam oven 25°C. ditambahkan 50 μ l buffer TE. Disimpan pada suhu -4°C.

2. Uji Kualitatif DNA

Isolat DNA yang telah didapat di uji secara kualitatif dengan menggunakan 1% (v/v) elektroforesis gel agarosa. Langkah awal elektroforesis yaitu dengan menyiapkan cetakan gel beserta sisir sumur guna membuat gel elektroforesis. Gel agarosa dibuat dengan takaran 1% dalam 40 mL buffer TBE 1X. Pembuatan gel dengan menimbang 0.4 gr bubuk agarose dan dilarutkan dalam 40 mL buffer TBE 1X. Gel agarosa dididihkan dengan microwave sampai agar larut dan berwarna bening. Gel agarosa yang sudah tidak panas ditambahkan 2 μ l EtBr kemudian dituangkan ke dalam cetakan gel beserta sisir sumur sampel. Selanjutnya gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Gel dan cetakan kemudian direndam pada larutan buffer TBE 1X pada kolom elektroforesis. Sampel hasil isolasi dimasukkan dalam sumur sebanyak 3 μ l dan *loading dye* sebanyak 1 μ l (3:1). Selanjutnya sampel dielektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Gel hasil elektroforesis divisualisasi dengan Gel DocTM XR imaging system BIO-RAD.

3. Uji Kuantitatif DNA

Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu dengan uji kuantitas DNA genom menggunakan nanodrops AE-Nano 200 *Nucleid Acid Abalyzer* versie 2.0. Langkah pertama diletakkan blank pada tempat sampel nanodrop. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260nm dan 280nm.

Uji kemurnian DNA genom dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dengan absorbansi 280 nm (A_{260}/A_{280}) dan rasio absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 230 nm (A_{260}/A_{280}).

Nilai kemurnian DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dan fenol dalam larutan. Molekul DNA dikatakan murni jika A_{260}/A_{280} tersebut berkisar 1.8-2.0 dan rasio absorbansi A_{260}/A_{280} berkisar 2.0-2.2. Jika nilai rasio A_{260}/A_{280} lebih kecil dari 1.8 maka isolat DNA kontaminasi berupa fenol dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Sedangkan jika nilai rasio A_{260}/A_{280} lebih dari 2.0 maka isolat DNA kontaminasi protein dan senyawa lainnya (Sambrook, 2001).

4. Amplifikasi DNA

Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak pita DNA dengan menggunakan primer ITS rDNA yaitu ITS 1 (*forward*) dan ITS 4 (*revers*) (Tabel 3.1) (Hidayat, 2008):

Tabel 3.1 Sekuens Primer

Primer	Gen Primer
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4	TCCTCC GCTTATTGATATGC

Amplifikasi gen ITS pada penelitian ini menggunakan primer ITS 1 dan ITS 4. Total volume total dalam PCR adalah sebesar 25 μ l dengan komposisi (Tabel 3.2) (Geisen, 2017):

Tabel 3.2 komposisi bahan dan volume amplifikasi DNA

Bahan	Jumlah
DNA template	1,5
Primer ITS 1 (<i>forward</i>)	0,5
Primer ITS 4 (<i>reverse</i>)	0,5
PCR mix (dNTPs (2.5mM, 10x buffer PCR, 2.5 <i>Taq</i> DNA polymerase	12,5
<i>Nucleus Free Water</i>	10

PCR dilakukan dengan menggunakan *My Cyclyer™ Cyclyer* BIO-RAD *Thermo*
Cyclyer mengikuti prosedur standar (Tabel 3.3) (Chowdhary, 2015):

Tabel 3.3 Prosedur PCR

Tahap	Suhu	Waktu	Siklus
Pra-denaturasi	95°C	15 menit	1x
Denaturasi	95°C	1 menit	35x
Anneling	56°C	30 detik	35x
Ekstensi	72°C	1 menit	35x
Final Ekstensi	72°C	10 menit	1x

Selanjutnya hasil akhir PCR dianalisis dengan menggunakan elektroforesis pada konsentrasi gel agarose 1% (berat/volume) dengan tegangan listrik sebesar 100 volt, 400 mA selama 30 menit. Gel diwarnai dengan etidium bromida kemudian divisualisasi dengan menggunakan Gel Doc™ XR Imaging System BIO-RAD.

5. Sekuensing DNA

Hasil PCR, primer ITS 1 dan ITS 4 dikirim kepada pihak BIONEER Korea (<https://eng.bioneer.com>) untuk dilakukan proses *sequencing* selama kurun waktu kurang lebih satu minggu.

6. Alignment

Data hasil *sequencing* selanjutnya diurutkan dan dipotong dengan menggunakan software BioEdit.

7. Proses Similaritas Hasil *Sequencing*

Data yang didapatkan selanjutnya di proses dalam webserver BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) untuk mengetahui *homology* hasil *sequencing* dengan *sequence* spesies yang sudah ada di *genbank*. Persentasi similaritas tertinggi yang di pilih (Widowati, 2016).

8. Rekronstruksi Filogenetik

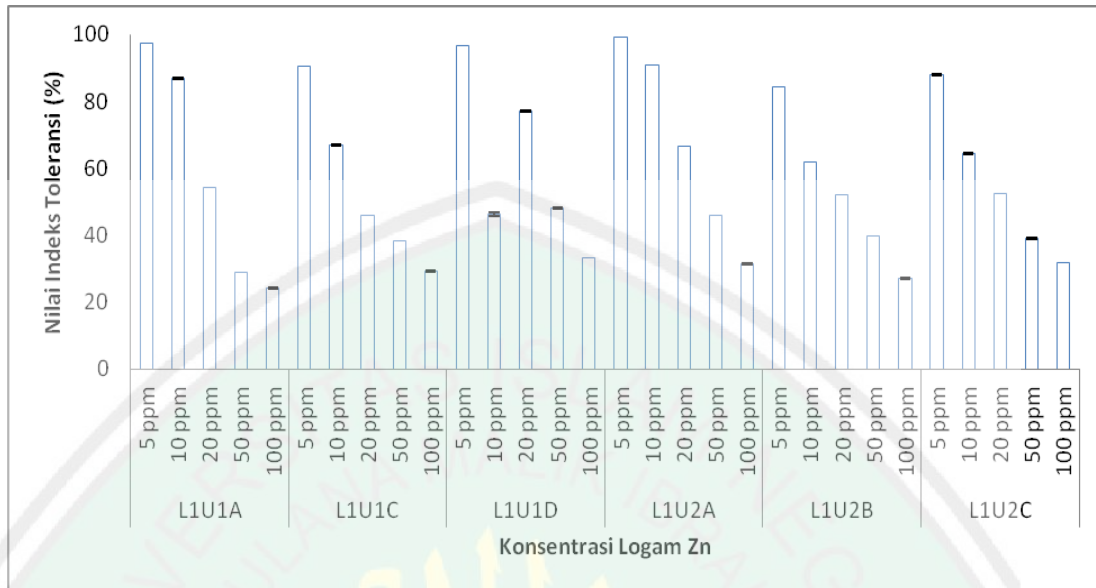
Data hasil *sequencing* kemudian di lakukan rekonstruksi filogenetik dengan menggunakan software MEGA 6.06, begitu pula dengan sekuen spesies pembanding *ingroup* dan *outgroup* yang didapatkan dari *genbank* dengan format fasta. Pohon filogenetik dibuat menggunakan metode Neighbor-joining (Zhou, 2015).

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

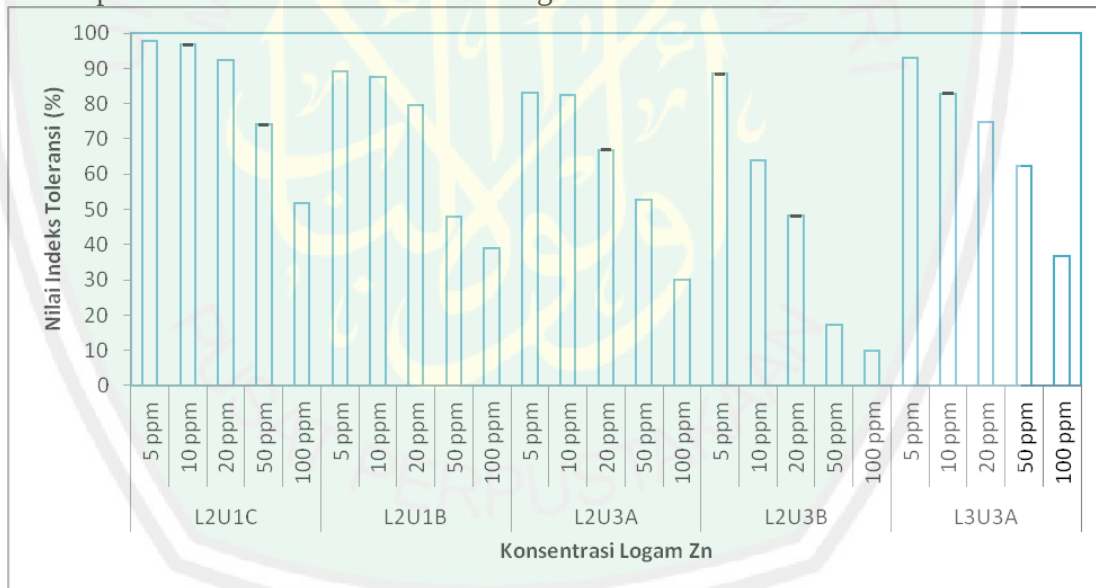
4.1. Kemampuan Toleransi Fungi Endofit Akar Gletang (*Tridax procumbens*) terhadap Logam Zn

Sebelas isolat fungi endofit dari akar Gletang (*Tridax procumbens*) yang berada di laboratorium Mikrobiologi dilakukan peremajaan pada media baru PDA (*Potato Dextruse Agar*) untuk selanjutnya dilanjutkan uji toleransi (lampiran 1). Isolat fungi diberi perlakuan uji toleransi terhadap logam berat Zn dengan konsentrasi 0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm. Isolat fungi kemudian ditimbang berat keringnya untuk didapatkan nilai TI (*Tolerance Index*) sebagai dasar bahwa fungi mampu toleran terhadap logam Zn.

Berdasarkan gambar 4.1. menunjukkan pertumbuhan 11 isolat fungi terhadap perbedaan konsentrasi logam Zn. Pada konsentrasi 5 ppm mampu bertahan dengan nilai indeks toleransi rata-rata >80%. Konsentrasi 10 ppm mulai terlihat beberapa penurunan nilai indeks toleransi, namun nilai indeks toleransi masih rata-rata >50%. Konsentrasi 20 ppm, 50 ppm, dan 100 ppm terlihat jelas penurunan nilai indeks toleransi secara signifikan, dan menyisahkan 2 isolat dengan nilai indeks tertinggi yaitu isolat kode L2U1A (51,9208%) dan L2U1B (39,0325%) (lampiran 3). Menurut Mahmood (2007) indeks toleransi digunakan untuk mengevaluasi kemampuan toleransi suatu organisme terhadap kerentanan dari efek logam berat,



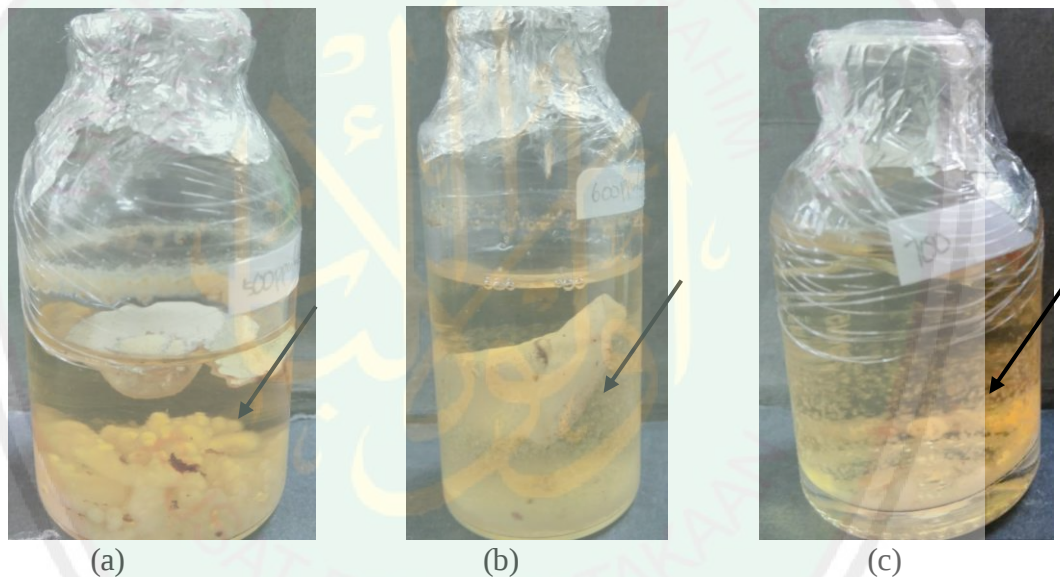
Gambar 4.1. a. Pengaruh variasi konsentrasi logam Zn 5, 10, 20, 50 100 ppm terhadap nilai indeks toleransi 6 isolat fungi.



Gambar 4.1. b. Pengaruh variasi konsentrasi logam Zn 5, 10, 20, 50 100 ppm terhadap nilai indeks toleransi 5 isolat fungi.

Menurut Yan Li (2011) menyatakan bahwa isolat fungi dapat dikategorikan toleran terhadap logam seng (Zn) jika memiliki persentase nilai indeks toleransi yaitu lebih dari 50% dalam konsentrasi logam Zn sebesar 11,5 ppm. Dua isolat yang

memiliki persentase tinggi diseleksi kembali untuk mendapatkan isolat terpilih yang mampu toleran terhadap logam Zn pada konsentrasi yang tinggi. Dua isolat fungi di uji lanjut dengan konsentrasi 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, dan 700 ppm. Didapatkan 1 isolat fungi endofit yang mampu toleran hingga konsentrasi 700 ppm yaitu isolat fungi kode L2U1A, sedangkan pada isolat L2U1B hanya mampu toleran sampai konsentrasi 400 ppm.

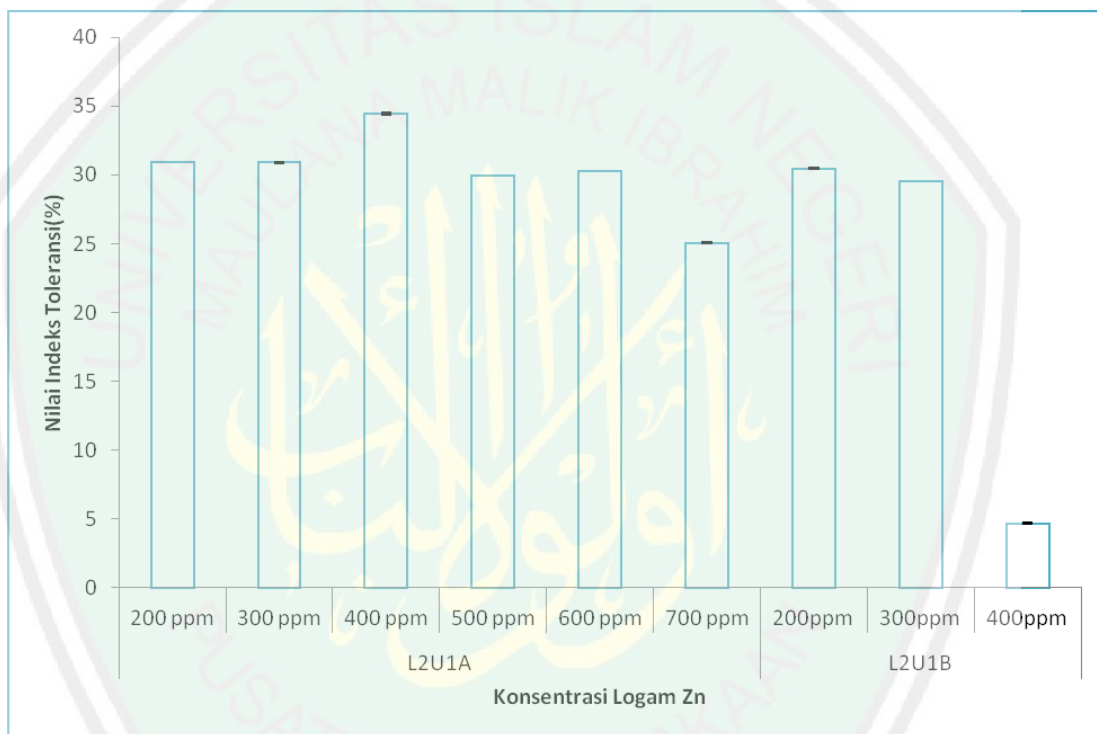


Gambar 4.2. Isolat fungi kode L2U1A pada konsentrasi yang berbeda (a) 500 ppm, (b) 600 ppm, (c) 700 ppm.

Ket: $\swarrow$: menunjukkan adanya miselia fungi yang tumbuh.

Toleransi isolat fungi L2U1A dapat dilihat secara visual dengan tumbuhnya miselium pada media cair PDB (*Potato Dextrose Broth*), hingga menempel di dinding botol yang digunakan (gambar 4.2). Menurut Rochman (2015) miselium fungi

berfungsi untuk membantu penyerapan nutrisi, bahan organik, dan air yang digunakan untuk proses perkembangan dan pertumbuhan fungi, sehingga munculnya miselium pada media dapat diindikasikan bahwa adanya fungi yang hidup pada media tersebut.



Gambar 4.3. Pengaruh variasi konsentrasi logam Zn 200, 300, 400 500, 600, 700 ppm teradap nilai indeks toleransi 2 isolat fungi.

Berdasarkan gambar 4.3. isolat fungi L2U1A memiliki nilai indeks toleransi dari konsentrasi logam terkecil berturut-turut yaitu 33,1975%, 30,8886%, 301513%, 27.629%, 22,2934%, 12,8444%. Sedangkan pada isolat fungi kode L2U1B hanya mampu bertahan pada konsentrasi 400 ppm dengan nilai indeks toleransi 4,0521%

(lampiran 3). Menurut Shakya (2015) pada setiap spesies fungi memiliki kemampuan toleransi terhadap logam berat yang berbeda-beda, tiap spesies fungi memiliki perbedaan pada penyusun dinding sel fungi dengan fungsi yang berbeda pada setiap spesiesnya.

Nilai indeks toleransi menggunakan berat kering miselium fungi merupakan salah satu metode untuk mengetahui kemampuan toleransi fungi terhadap logam berat. Dimana miselium fungi memiliki peran penting pada menyerapan mikronutrisi. Mikronutrisi yang dibutuhkan oleh fungi untuk perkembangan dan pertumbuhan salah satunya yaitu unsur logam Zn, namun Zn juga berpotensi menjadi racun jika berjumlah banyak. Unsur Zn dibutuhkan pada enzimatis yang meliputi proses transferase, hidrolisis, lisis, isomerase dan ligase pada sel. Fungi endofit yang dibawah tekanan logam Zn akan mengakumulasi Zn ke dalam hifa. Hifa berperan penting pada mekanisme toleransi fungi terhadap logam berat Zn (Monnet 2011).

Fungi memiliki beberapa macam cara untuk mampu bertahan pada kondisi lingkungan yang kurang mendukung, seperti halnya pada cemaran logam berat. Menurut Hall (2002) pada tingkat seluler, fungi memiliki berbagai cara untuk mampu bertahan pada kondisi lingkungan yang tercemar logam berat terutama Zn, mekanisme ekstraseluler terjadi pada dinding sel fungi (adsorpsi) dan intraseluler yang terjadi di dalam sitosol (absorpsi). Hal ini diperkuat oleh Tan (2003) dan Kumar (2008) yang menyatakan bahwa mekanisme ekstraseluler terutama dapat terjadi pada proses biosorpsi sel terhadap toksisitas logam berat.

Mekanisme ekstraseluler toleransi fungi terhadap logam berat dapat secara akumulasi/presipitasi, adsorpsi atau absorpsi (Muraleedharan, 1991). Menurut Sintuprapa (2000) mekanisme toleransi logam jenis Zn^{2+} pada fungi *Penicillium* sp. dengan cara penyerapan Zn^{2+} oleh sel hidup yang terlibat pada adsorpsi ekstraseluler (dinding sel) dan intraseluler (sitosol) menjadi bentuk zinc kompleks di dalam sel. Presentase Zn pada dinding sel (adsorpsi) meningkat menjadi 14,16-21,08%, sedangkan pada proses absorpsi, vakuola memiliki peran sebagai tempat penyimpanan akumulasi sejumlah zat racun termasuk logam Zn (Lasat, 2000). Vakuola sebagai salah satu organel sel yang memiliki besar 90% total volume keseluruhan dalam sitoplasma dan bersifat dinamis dapat menyimpan 45-49% Zn terlarut (Teng, 2017).

Spesies fungi *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus fumigatus* mampu toleran pada kondisi media dengan konsentrasi logam Zn mencapai 4000 mg/L. *Aspergillus flavus* dan *Aspergillus fumigatus* memproses logam Zn dengan mekanisme *binding site wall* (biosorpsi) dengan kemampuan biosorpsi mencapai persentase $11.63 \pm 0.035\%$ pada *A. flavus* dan $24.00 \pm 0.088\%$ pada *A. fumigatus* (Faryal, 2006). Hal ini diperkuat oleh penelitian Yan Li (2011) yang menyebutkan bahwa *Aspergillus* sp. dan *Steganosporium* sp. mampu toleran pada logam Zn dengan nilai indeks toleransi 80%, sedangkan fungi jenis *Alternaria* sp. dan *Peyronellaeae* sp. juga mampu toleran pada logam Zn dengan nilai indeks toleransi mencapai 59% dan 67%. Pada jenis fungi *Aspergillus terreus* mampu melakukan adsorpsi pada logam Cu hingga 60-71 mg Cu^{2+}/l dengan Ph 4,2 (Gulati, 2002). Sedangkan pada penelitian

yang dilakukan oleh Dias (2002) *Aspergillus terreus* mampu menghilangkan logam 40-600 mg Cr ml⁻¹, 5-230 mg Ni ml⁻¹, dan 50-700 mg Fe ml⁻¹ dengan persentase berturut-turut 75%, 90%, dan 85% dengan menggunakan media *sabouraud broth*.

4.2. Identifikasi Morfologi dan Molekuler Isolat Fungi Endofit

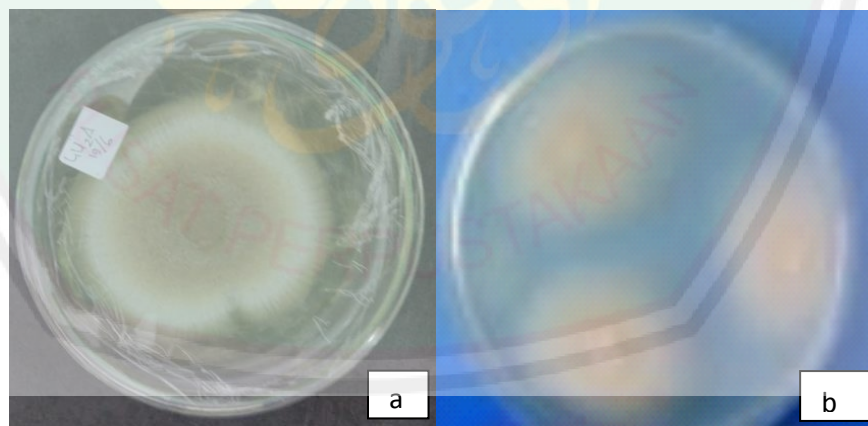
4.2.1 Identifikasi Morfologi

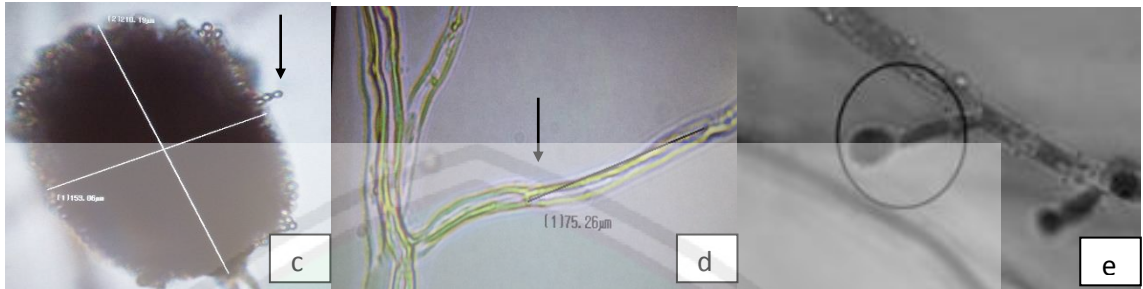
Berdasarkan hasil pengamatan yang sudah dilakukan, didapatkan satu isolat terpilih yang memiliki kemampuan toleran terhadap logam ZnCl₂.H₂O hingga mencapai konsentrasi 700 ppm. Isolat fungi tersebut kemudian dilakukan identifikasi morfologi dan molekuler. Pada identifikasi morfologi terdapat dua cara identifikasi yaitu secara makroskopis dan mikroskopis (tabel 4.1.), dimana hal ini akan mengaju pada buku *Pictoral Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species 2th Edition* (Watanabe, 2002), *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Barnet & Barry, 2000).

Tabel 4.1. Karakter morfologi isolat fungi endofit terpilih secara makroskopis dan mikroskopis

Karakter Morfologi	Kode L2U1A
Permukaan koloni atas	Warna koloni coklat muda dengan tepi putih, tekstur koloni halus.
Permukaan koloni bawah	Warna koloni coklat muda kekuning
Diameter koloni	Pada hari ketujuh sebesar 7 cm
Lingkar konsentris	Tidak ada
Hifa	bersekat, bercabang, lebar 13,40 µm, panjang hifa antar sekat 75,26 µm
Konidia	Ukuran 153,86-210,19 µm, bentuk elips, ujung tumpul
Dugaan isolat	<i>Aspergillus</i>

Penampakan secara makroskopis isolat fungi kode L2U1A memiliki permukaan atas yang berwarna coklat muda dengan tepi putih dan bertekstur halus, sedangkan pada bagian bawah koloni memiliki warna coklat muda kekuning, diameter koloni 7 cm dalam umur 7 hari, tidak memiliki lingkaran konsentris. Pengamatan mikroskopis menggunakan metode *slide culture*, menurut Rosana (2014) metode ini memiliki daya simpan yang lebih lama untuk menyimpan gambaran morfologi fungi dibandingkan dengan metode selotip. Berdasarkan pengamatan mikroskopis didapatkan hasil yaitu fungi memiliki hifa bersekat dan bercabang, lebar hifa 13,40 μm , panjang hifa antara sekat yaitu 75,26 μm . Konidia ketika berumur 7 hari memiliki lebar 153,86 μm sedangkan panjangnya 210,19 μm , memiliki bentuk elips dan ujungnya tumpul (Gambar 4.4).





Gambar 4.4. Pengamatan makroskopis dan mikroskopis (a) isolat fungi kode L2U1A tampak permukaan atas (b) isolat *A.terreus* (Diba, 2007) (c) konidia dan konidiofor (perbesaran 1000x) (d) hifa bersekat (perbesaran 1000x) (koleksi pribadi, 2019) (e) lingkaran hitam menunjukkan konidia *A.terreus* (Deak, 2004).

Aspergillus terreus memiliki permukaan yang halus, berbentuk *glubose*, diameter konidia berkisar 100-250 μm , permukaan konidia berdinding halus (Diba, 2007) hal ini diperkuat oleh McClenny (2005) yang menyatakan bahwa *A.terreus* memiliki konidia yang berukuran kecil berbentuk bundar, memiliki hialin (aksesori konidia) yang melekat pada hifa vegetatif, koloni fungi memiliki warna oranye hingga kuning, *A.terreus* juga memiliki sifat patogen sehingga menyebabkan aspergilloma pada pernafasan manusia.

4.2.2. Identifikasi Molekuler

Satu isolat terpilih dengan kode L2U1A dilakukan identifikasi ke tingkat molekuler untuk mengetahui spesies fungi yang mempunyai toleransi terhadap logam Zn tersebut. Identifikasi molekuler banyak digunakan peneliti sebagai salah satu metode untuk mengetahui genus hingga spesies suatu mikroorganisme dengan menganalisis urutan DNA nya. Menurut Faatih (2009) DNA ialah serangkaian materi

genetik yang berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis dan memiliki sifat hereditas (penurunan sifat genetik secara turun temurun) pada makhluk hidup.

Allah SWT telah berfirman dalam Al-Quran surah Al-Furqan ayat 2 yang berbunyi:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَّخِذْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya: Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak, dan tidak ada sekutu bagi-Nya dalam kekuasaan(Nya), dan dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya (Q.S. Furqan:2)

Menurut Tafsir Al-Qurtubi (2009), kalimat فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا memiliki maksud yaitu menetapkan segala sesuatu dari apa yang diciptakan-Nya sesuai dengan hikmah yang diinginkan-Nya, dan segala sesuatu dengan ketentuan-Nya. Hal ini jika dihubungkan dengan DNA sebagai material genetik terpenting di dalam makhluk hidup memiliki ukuran-ukuran tertentu mencapai fungsinya, seperti halnya pada panjang DNA daerah konserv ITS yang memiliki panjang berkisar 700 bp, sehingga daerah ini banyak digunakan peneliti untuk mengidentifikasi fungi.

Identifikasi molekuler dengan mengekstrak DNA fungi menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang termodifikasi Doyle dan Doyle (1987), CTAB berfungsi sebagai pengikat protein dan polisakarida pada sel dan akan mengendapkannya menjadi pellet, sedangkan DNA akan terlarut pada air. DNA kemudian dimurnikan dengan menggunakan kloroform dan isoamilalkohol dengan perbandingan 24:1. Kloroform berfungsi untuk memisahkan larutan menjadi dua fase,

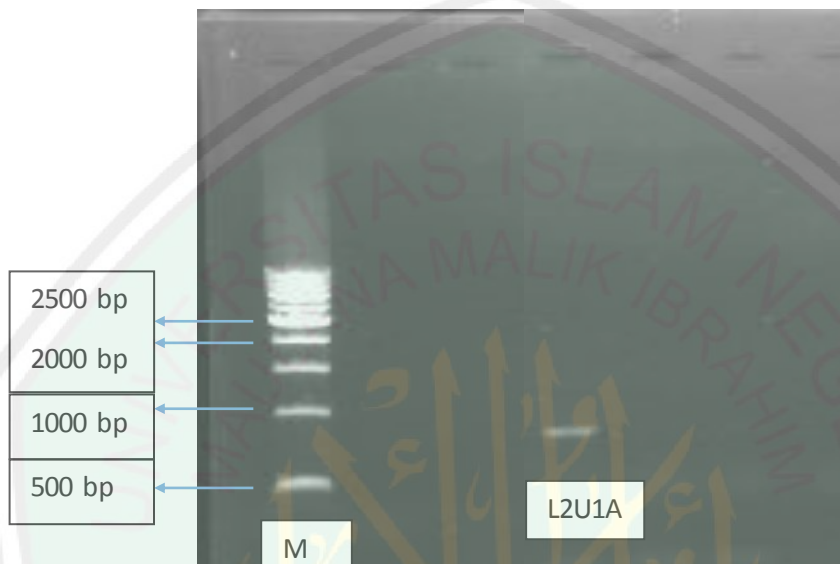
cair dan padat dimana fase cair (supernatan) adalah DNA dan fase padat (pellet) yang merupakan campuran antara protein dan DNA (Faatih, 2009).

DNA selanjutnya ditambahkan isopropanol yang bertugas untuk mengendapkan (presipitasi) DNA yang terlarut didalam air, isopropanol akan bekerja dengan baik jika suhu mencapai -4°C (Turan, 2015) sehingga DNA disimpan di dalam lemari es selama semalam. DNA akan terlihat dengan munculnya cairan berwarna lebih bening di dalam tube.

Ekstrak DNA yang sudah didapatkan kemudian dilihat kemurniaannya dengan uji kuantitatif menggunakan *nanodrop* dengan panjang gelombang $\text{\AA}260/\text{\AA}280$ dan nilai range kemurnian DNA berkisar 1,8-2,0 (Sambrook, 2001). Pada sampel kode isolat L2U1A memiliki nilai kemurnian 1,09 yang berarti adanya kontaminasi RNA (lampiran 4). Menurut Faatih (2009) jika nilai kemurnian DNA $<1,8$ maka sampel ekstrak DNA terkontaminasi oleh RNA, sedangkan jika $>2,0$ maka sampel ekstrak DNA terkontaminasi oleh protein dan senyawa organik lainnya.

Uji selanjutnya yaitu amplifikasi DNA dengan teknik PCR yang menggunakan pasangan primer ITS 1 (*forward*) dan ITS 4 (*revers*). Menurut Legiastuti (2012) primer pasangan ITS 1 dan ITS 4 mampu mengamplifikasi daerah konserv ITS pada fungi, dimana daerah tersebut banyak digunakan peneliti sebagai identifikasi molekuler pada fungi. Hasil PCR selanjutnya divisualisasi menggunakan Gel doc dan didapatkan hasil bahwa pada isolat kode L2U1A memiliki panjang 686 bp, hal ini dapat diketahui dengan melihat hasil *sequencing* menggunakan software

Bioedit (gambar 4.5.). Hal ini sejalan dengan penuturan Baldwin (1995) yang menyatakan bahwa daerah konserv ITS memiliki panjang DNA kurang lebih 700 bp.



Gambar 4.5. Hasil visualisasi PCR dengan menggunakan Gel doc. M: Marker, L2U1A: Isolat fungi

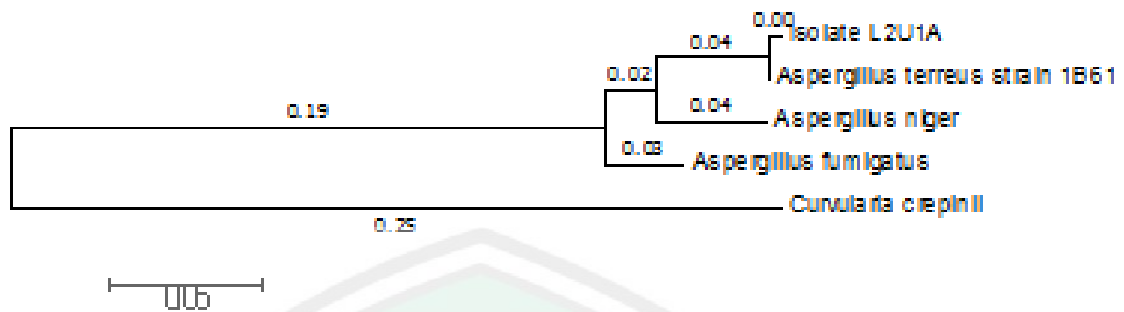
Hasil *sequencing* selanjutnya dianalisis dengan menggunakan web server BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) untuk mengetahui kemiripan dengan urutan DNA yang sudah ada di *genbank* NCBI. Menurut Dufour (2003) dua jenis organisme memiliki urutan DNA yang sama jika memiliki persentase homologi sebesar 99-100% maka dapat dikatakan satu spesies, namun jika persentase homologinya 98% maka dapat dikatakan organisme tersebut satu genus bukan satu spesies. Berdasarkan hasil BLAST (Tabel 4.2), hasil *sequencing* isolat fungi L2U1A memiliki kemiripan 99,65% pada spesies *Aspergillus terreus* strain 1B61, kemudian

99,64% pada spesies *Aspergillus terreus* isolate C23-3, kemiripan 99,64% ada spesies *Aspergillus terreus* strain 4784 (lampiran 5).

Tabel 4.2 Hasil proses BLAST untuk nilai *homology* (99%) antara hasil *sequencing* isolat L2U1A dengan *sequence* pembandingan dalam data *genbank*.

No	Jenis Isolat	Similarity (%)
1	<i>Aspergillus terreus</i> stain 1B61	99,65%
2	<i>Aspergillus terreus</i> isolate C23-3	99,64%
3	<i>Aspergillus terreus</i> stain 4784	99,64%
4	<i>Aspergillus nomius</i> stain KG 21	99,64%
5	<i>Aspergillus tubingensis</i> stain MSEF76	99,64%
6	<i>Aspergillus terreus</i> isolate A6a	99,47%
7	<i>Aspergillus tubengensis</i> strain ATU-KSU09	99,64%
8	<i>Aspergillus terreus</i> isolate S21	99,64%
9	<i>Aspergillus terreus</i> strain AKF2	99,64%
10	<i>Aspergillus terreus</i> isolate PKU F22	99,12%

Hasil proses similatiras dengan menggunakan web server BLAST, isolat fungi selanjutnya dilakukan analisis filogenetik untuk mengetahui kekerabatan dengan spesies fungi yang lain. Menurut Li (1999) pohon fiogenetik mempunyai fungsi untuk mengkonstruksi secara tepat hubungan antara organisme satu dengan yang lainnya sehingga mampu untuk mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunan selanjutnya.



Gambar. 4.6. Rekonstruksi pohon filogenetik dengan metode Neighbor Joining bootstrap isolat fungi endofit dari akar *Tridax procumbens*.

Berdasarkan gambar 4.6. dapat diketahui bahwasanya isolat fungi endofit L2U1A memiliki nilai similaritas sebesar 99% dengan jarak genetik 0,04 sehingga kedua isolat memiliki kemiripan yang tinggi. Isolat fungi L2U1A, *A. terreus* strain 1B61, *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* termasuk dalam satu clad yang berarti masih memiliki kekerabatan yang dekat dengan ketiga jenis fungi tersebut sebagai pembanding *ingroup*, sedangkan *A. terreus* dengan *C. crephii* sangat jauh hubungan kekerabatannya sebagai pembanding *outgroup* karena sudah tidak dalam satu clad, Hal ini diperkuat oleh Zhou (2015) yang menyatakan bahwa *Aspergillus terreus* dan *Aspergillus niger* termasuk dalam satu clad yang berarti kedua jenis fungi ini memiliki kekerabatan yang sangat dekat.

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini yaitu:

1. Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan dari 11 isolat fungi endofit dari akar *T. procumbens* didapatkan satu isolat fungi endofit L2U1A yang mampu bertahan hingga konsentrasi logam Zn 700 ppm.
2. Berdasarkan pengamatan secara morfologi dan molekuler isolat fungi endofit L2U1A memiliki similaritas tertinggi dengan spesies *Aspergillus terreus* strain 1B61 sebesar 99,65%.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan, ditemukan beberapa isolat fungi endofit yang memiliki kemampuan toleransi terhadap logam Zn namun peneliti tidak mengamati secara langsung mekanisme terjadinya proses toleransi hingga fungi mampu bertahan pada konsentrasi yang tinggi. Selain itu identifikasi secara kimiawi tidak dilakukan oleh peneliti untuk melengkapi data identifikasi secara sempurna.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, Salman H, dkk. 2014. Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Journal of Chemical Science and Technology*. Vol 3 (4).
- Agusta A., Maehara S, Ohashi K, Simanjuntak P, Shibuya H. 2005. Stereoselective Oxidation at C-4 o Flavans by The Endophytic ungu *Diaporthe* sp. Isolated from a Tea Plant. *Chem Pharm Bull*. Vol 53.
- Ahmad, I., Zafar S, Ahmad F. 2005. Heavy metals biosorption potential of *Aspergillus* and *Rhizopus* sp isolated from wasterwater treated soil. *J Appl Sci Environ Manag*. Vol 9.
- Ahmad, Riza Zainuddin. 2018. Mikoremediasi Menghilangkan Polusi Logam Berat pada Lahan Bekas Tambang untuk Lahan Peternakan. *WARTAZOA*. Vol 28.(1).
- Aishwarya. S, Venkateswarlu. N, Chandra mouli. K, Vijaya. T. 2014. Role of Endophytic Fungi in Restoration of Heay Metal Contaminated Soils. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 4(11).
- Akhtar, Shazia, Muammad Mahmood-ul-Hassan, Rizwan Amad, Vishandas Sutor and Muammad Yasin. 2013. Metal Tolerance Potential of FFilamentous FFungi Isolated from Soil Irrigated with Untreated Municipal Effluent. *Soil Science Socioty o Pakistan*. Vol 32 (1).
- Al-Qurtubi, Abu Abdillah Muhammad bin Ahmad. 2009. *Tafsir Al-urthubi*. Terjemahan oleh Muhyidin Mas Rida. Jakarta: Pustaka Azam.

- Anahid, S, S. Yaghmaei, Z. Ghobadinejad. 2011. Heavy Metal Tolerance of Fungi. *Scientia Irania*. Vol 18. No 3.
- Ankita, jain. 2012. *Tridax procumbens* (L): a weed with immense medicinal importance: a review. *International journal of pharma and bio sciences*. Vol 3(1).
- Arunakumara KKIU, Zhang X. 2007. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *J Ocean Univ China*. 7:60-64.
- Baldwin, B.G. Sanderson M., Porter J.M, Wojciechowski M.,, Campbell C.S, Donoghue MJ. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missori Bot Gard*. Vol 82.
- Barnet, H. L.and Hunter, B. B. 2000. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Third Edition)*. Minnesota: Burgess Publishing Company.
- Bellion, Marc., Mikael Courbot, Christophe Jacob, Damien Blaudez, dan Micael Chalot. 2005. Extracellular and Cellular Mechanisms Sustaining Metal Tolerance in Ectomycorrhizal Fungi. *Federal of European Microbiological Societies*. Vol 254.
- Chipasa KB. 2003. Accumulation and fate of selected heavy metals in a biological wastewater treatment system. *Waste Manag*. Vol 23:135-143.
- Das, Nilanjana., R Vimala dan P Karthika. 2008. Biosorption of Heavy Metals-An Overview. *Indian journal of Biotechnology*. Vol 7.
- Deak, Eszter., Selwyn D. Wilson, Elizabeth White, Janice H. Carr, S. Arunmozhi Balajee. 2004. *Aspergillus terreus* Accessory Conidia Are Unique in Surace

Architecture, Cell Wall Composition and Germination Kinetics. *Plos ONE*. Vol 4 (10).

Dhakal RP, Ghimire KN, Inoue K. 2005. Adsorptive separation of heavy metals from an aquatic environment using orange waste. *Hydrometallurgy*. 79:182-190.

Dias, M.A., I.C.A. Lacerda, P.F. Pimentel, H.F. de Castro dan C.A. Rosa. 2002. Removal of Heavy Metals by an *Aspergillus terreus* Strain Immobilized in A Polyurethane Matrix. *Letters in Applied Microbiology*. Vol 34.

Diba, K., Kordbacheh P, Mirhendi SH, S Rezale, M Mahmoudi. 2007. Identification of *Aspergillus* Species using Morphological Characteristics. *Pak J Med Sci*. Vol 23 (6).

Doyle., JJ. & Doyle J.L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19:11-15.

Dwidjoweputro. 1978. *Pengantar Mikologi*. Bogor: Penerbit Alumni.

Faatih, Mukhlissul. 2009. Isolasi dan Digesti DNA Kromosom Isolation. *Jurnal Penelitian Sains dan Teknologi*. Vol 10 (1).

Faryal, R., A. Lodhi, dan A. Hameed. 2006. Isolation, Characterization and Biosorption of Zinc by Indigenous Fungal Strains *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Pak. J. Bot*. Vol 38 (4).

Fu F, Wang Q. 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J Environ Manage*. 92:407-418.

- Gadd, G. M. and White, C. 1990. Microbial Treatment of Metal Pollution a Waorking Biotechnology. *Tibtech*. 11
- Gadd, G.M. 1993. Interaction of Fungi with Toxic Metals. *New Phytol*. Vol 124.
- Gandjar, Indrawati dan Wellyzer Sjamsuridzal. 2006. *Mikologi: Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Gavrilesco M. 2004. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. *Eng Life Sci*. 4:219-232.
- Geisen, S., Kostenko, O., Cnossen, M. C., ten Hooven, F. C., Vres, B., & van der Putten, W. H. 2017. Seed and Root Endophytic Fungi in a Range Expanding and a Related Plant Species. *Frontiers in Microbiology*. 8:1645.
- Govarthanan, M, dkk. 2016. Bioremediation of Heavy Metals using an Endophytic Bacterium *Paenicillus* sp. RM Isolated From The Roots of *Tridax procumbens*. 3 *Biotech*. Vol 6 (242).
- Gulati, Ruci, R.K. Saxena, dan Rani Gupta. 2002. Fermentation Waste of *Aspergillus terreus*: a Potential Copper Biosorbent.
- Gupta R, Mohapatra H. 2003. Microbial biomass: An economical alternative for removal of heavy metals from waste water. *Indian J Exp Biol*. 41:945-966.
- Hall, J. L. 2002. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance. *Journal of Experimental Botany*. Vol 53 (366).
- Hancock, I. P. 1996. Novel Concepts in Bioremediation of Heavy Metal Pollution and ina Biotreatment of Industrial Waste. *In Symposium and Workshop on Heavy Metal Bioaccumulation*. IUC Biotechnology Gadjah Mad University. Yogyakarta.

- Hidayat, Topik, dkk. 2008. Analisis Filogenetik Molekuler pada *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) Menggunakan Urutan Basa DNA Daerah Internal Transcribed Spacer (ITS). *Jurnal Matematika dan Sains*. Vol 13(1).
- Iram, Shazia, Iftikhar Ahmad, Barira Javed Saeeda Yaqoob, Kulsoom Akhtar, Munawar Raza Kazmi, dan Badar Uz Zaman. 2009. Fungal Tolerance to Heavy Metals. *Pak J Bot*. Vol 41(5).
- Kartono, Djoko, Hardinsyah, Abas Basuni Jahari, Ahmad Sulaeman, Mary Astuti, Moesijanti Soekatri, dan Hadi Riyadi. 2012. *Ringkasan Angka Kecukupan Gizi (AKG) Dianjurkan Bagi Orang Indonesia 2012*. Jakarta: LIPI.
- Kouba A, Buřić M, Kozák P. 2010. Bioaccumulation and effects of heavy metals in crayfish: A review. *Water Air Soil Pollut*. 211:5-16..
- Kumar N, Bauddh K, Kumar S, Dwivedi N, Singh DP, Barman SC. 2012. Accumulation og Metals in Weed Species Grown on The Soil Contamination with industrial Waste and Their Phytoremedition Potential. *Ecol Eng*. Vol 61.
- Kumar R, Bishnoi NR, Garima Bishnoi K. 2008. Biosorption of Chromium (VI) from aqueous solution and electroplating wastewater using fungal biomass. *Chem Eng J*.
- Kurniawan, Andri dan Nuraeni Ekowati. 2016. Review: Mikoremediasi Logam Berat. *Jurnal Bioteknologi dan Sains Indonesia*. Vol 3(1).
- Lasat, Mitch M. 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A review of Biological Mechanisms. *J Environ Qual*. Vol 31.

- Legiastuti, Tuti Susanti dan Tri Aminingsih. Identifikasi Cendawan Endofit Menggunakan Teknik Polymerase Chain Reaction. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. Vol 8(2).
- Li, Shuying Pearl dan Doss. 1999. Phylogenetic tree construction using markov chain monte carlo. *Journal of the American Statistical Association*. Vol 95.
- Mahmood, Tariq., K.R. Islam, dan S. Muhammad. 2007. Toxic Effects of Heavy Metals on Early Growth and Tolerance of Cereal Crops. *Pak. J. Bot.* Vol 39 (1).
- Martinez RJ, Beazley MJ, Tallefert M, Arakaki AK, Skolnick J, Sobecky PA. 2007. Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils. *Environ Microbiol.* 9:3122-3133.
- McClenny, N. 2005. Laboratory Detection and Identification of *Aspergillus* Species by Microscopic Observation and Culture : The Traditional Approach. *Medical Mycology*. Vol 43.
- Mehra, RK dan DR Winge. 1991. Metals ion Resistance in fungi: Molecular Mechanisms and Their Regulated Expression. *Journal of Cellular Biochemistry*.
- Monnet, Fabien., Nathalie Vaillant, Adnane Hitmi, Alain Coudret, dan Huguette Sallanon. 2011. Endophytic *Neotyphodium lolii* Induced Tolerance to Zn Stress in *Lolium perenne*. *Physiologia Plantarum*. Vol 113.

- Muraleedharan TR, Iyengar L, Venkobachar C. 1991. Biosorption: an attractive alternative for metal removal and recovery. *Curr Sci*. Vol 61.
- Naumi, Rizha Nahdia. 2015. Pertambangan Minyak Tradisional Di Desa Wonocolo, Kecamatan Kedawen, Kabupaten Bojonegoro Tahun 1970-1987. *Avatara E-journal Pendidikan Sejarah*. Vol 3(1).
- Notodarmojo, S. 2005. *Pencemaran Tanah dan Air Tanah*. Bandung: Penerbit ITB. ISBN 979-3507-43-8.
- Nugroho, Titania Tjandrawati, dkk. 2013. Optimasi isolasi dan amplifikasi ITS DNA Ribosomal Fungi Karbolitik Isolat Zona Inti Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu. *Prosiding Semirata MIPA*. Universitas Lampung.
- Nurdin. 1998. Biosorption seng dan kromium oleh biomassa *Aspergillus niger*. Tesis S2. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Ohimain EI, Olu DS, Abah SO. 2009. Bioleaching of heavy metals from abandoned mangrove dredged spoils in the Niger Delta: A laboratory study. *Delta*. 7:1105-1113.
- Pagnanelli F, Papini MP, Toro L, Trifoni M, Vegliò F. 2000. Biosorption of metal ions on *Arthrobacter* sp: Biomass characterization and biosorption modeling. *Environ Sci Technol*. 34:2773-2778.
- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah ilmu Kearifan*. Vol 2 (3).
- Raghu, V. 2001. Accumulation of Elements In Plants And Soils In and Around Mangampeta And Vemula Barite Mining Areas, Cuddapah District, Andhra Pradesh, India. *Environmental Geology*. Vol 40.

- Rochman, Abdul. 2015. Perbedaan Proporsi Dedek dalam Media Tanam Terhadap Pertumbuhan Jamur Tiram Putih (*Pleurotus florida*). *Jurnal Agribisnis*. Vol 11 (13).
- Rosana, Yeva., Tetsuhiro Matsuzawa, Toru Gonoj, dan Anis Karuniawati. 2014. Modified Slide Culture Method for Faster and Easier Identification of Dermatophytes. *Microbiology*. Vol 8 (3).
- Sambrook , J., and Russel, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3th Edition*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sani, Aishwarya. 2017. Characterization of Heavy Metal Resistant Endophytic Fungi from *Boswellia Ovalifoliolata*. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research*. Vol 3(2).
- Sembel, Dantje T. 2015. *Toksikologi Lingkungan*. Yogyakarta: CV.Andi Offset.
- Shakya, Manisa, Pratibha Sharma, Syeda Shaima Meryem, Qaisar Mahhmood, dan Arum Kumar. 2015. Heavy metal Removal from Industrial Wasterwater Using Fungi: Uptake Mechanism and Biochemical Aspects. *Journal of Enviromental Engineering*.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati Press.
- Siddiquee S, Aishah SN, Azard SA, Shafawati SN, Naher L. 2013. Rolerance and biosorption capacity of Zn, Pb, Ni, and Cu by filamentous Fungi 9Trichoderma harzianum, T. aureoviride and T. virens). *Adv Biosci Biotechnol*. Vol 4.

- Sintuprapa W, Thiravetyan P, Tantichharoen M . 2000. A possible mechanism of Zn^{2+} uptake by living cells of *Penicillium* sp. *Biotechnol Lett*. Vol 22.
- Smical A, Hotea V, Oros V, Juhasz J, Pop E. 2008. Studies on transfer and bioaccumulation of heavy metals from soil into lettuce. *Env Eng Manag*. 7:609-615.
- Tan T, Cheng P. 2003. Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. *Appl Biochem Biotech*. Vol 104.
- Tan, R.X. dan W X. Zou. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep*. Vol 18.
- Teng, Yue., Xienzeng Du, Tao Weng, Chenyu MI, Hongyen Yu, dan Luyi Zou. 2017. Isolation of a Fungus *Penicillium* sp. with Zinc Tolerance and its Mechanism of Resistance. *Arch Microbiol Springer*.
- Tobin, White and Gadd. 1994. Metal Accumulation by fungi: Applications in Environmental Biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology*. 13.
- Turan, Cemal. 2015. Microsatellite DNA reveals genetically different populations at Atlantic coast *Sarda sarda* in the Mediterranean Basin. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol 63.
- Vicente, M.C, F.A. Guzman, J. Engels, V.R Rao. 2005. Genetic Characterization and its use in Decision Making for the Conservation of Crop Germplasm. *The Role Biotechnology*. 121-128.
- Wanatabe, Tsuneo. 2002. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies off Culture Fungi and Key to Species*. New York: CRC Press.

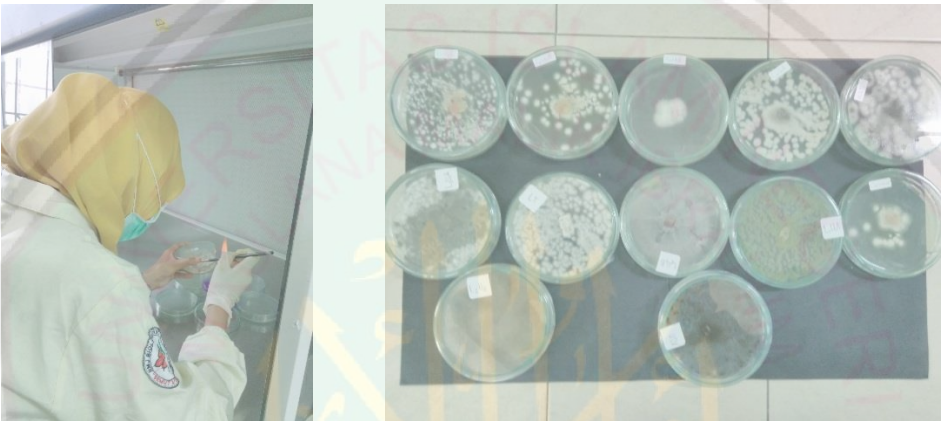
- Wang, X et al. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. Vol 27.
- Wani PA, Ayoola OH. 2015. Bioreduction of Cr (VI) by heavy metal resistant *Pseudomonas* species. *J Environ Sci Technol*. 8:122-130.
- Widowati, Tiwit., Bustanussalam, Harmastini Sukiman, dan Partomuan Simanjuntak. 2016. Isolasi dan Identifikasi Kapang Endofit dari Tanaman Kunyit (*Curcuma longa* L.) sebagai Pengasil Antioksidan. *Biopropal Industri*. Vol 7(1).
- Widowati, W., Sastiono. A, Jusuf, R. 2008. *Efek Toksik Logam Pencegahan dan Penanggulangann Pencemaran*. Yogyakarta: ANDI
- Worang, R. L. 2003. Fungi Endofit sebbagai Penghasil Antibiotika. Tesis S2 Fakultas Biologi Yogyakarta, UGM.
- Yan li, Hai., Dong-Wei LI, Cai-Mei HE, Zuo-Ping ZHOU, Tao MEI, Hong-Mei XU. 2011. Diversity and Heavy Metal tolerance of endopytic ungi from six dominant plant species in a Pb-Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecology*. Vol 5.
- Zhou, When-Na, James F.White, Jr., Marcos A. Soares, Monica S.Torres, Zuo-Ping Zou dan Hai-Yan Li. Diversity of ungi associated with plasnt growing in geothermal ecosystems and evaluation of their capacities to enhance thermotolerance of host plants. *Journal of plant interactions*.

LAMPIRAN

Lampiran 1

Peremajaan 11 isolat fungi pada media PDA

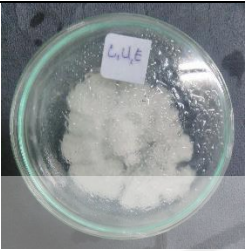
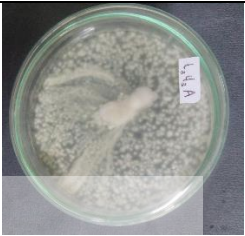
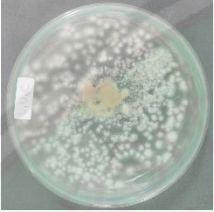
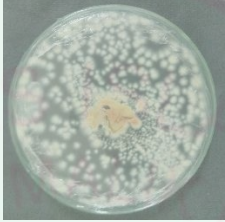
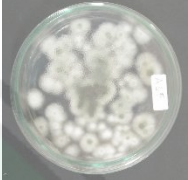
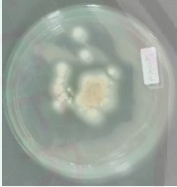
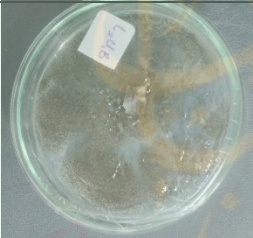
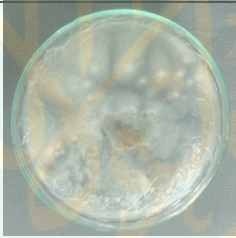
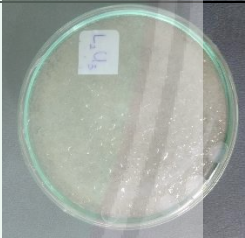
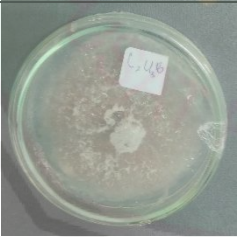
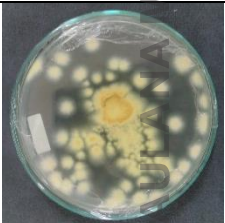
a. Peremajaan



Pengambilan sampel setelah 7 hari di media PDA

b. Pemurnian Fungi Endofit

Kode isolat	Gambar Permukaan Atas	Gambar Permukaan Bawah	Kode Isolat	Gambar Permukaan Atas	Gambar Permukaan Bawah
L1U1A			L1U1C		

L1U1D			L1U2A		
L1U2B			L1U2C		
L1U3A			L2U1A		
L2U1B			L2U3A		
L2U3B			L3U3A		

Lampiran 2

Persiapan sediaan larutan stok $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1. Perhitungan Larutan Stok $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1000 ppm

$$\begin{aligned}
 1000 \text{ ppm} &= 1000 \text{ mg/L Zn} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{\text{Total Mr ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}}{\text{Mr Zn}} \\
 &= 1000 \text{ mg/L} \times 0.001 \times 2.359760 \\
 &= 2.35976 \text{ g/L}
 \end{aligned}$$

Jadi, untuk membuat larutan stok $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dengan konsentrasi 1000ppm, dibutuhkan serbuk $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebesar 2.35976g dan dilarutkan kedalam 1000ml aquades steril.

2. Pembuatan media beserta konsentrasi Logam $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Perhitungan ini menggunakan rumus: $V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$

Keterangan: V_1 : Volume larutan stok $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

V_2 : Volume media total

M_1 : Konsentrasi larutan stok $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

M_2 : Konsentrasi yang dibutuhkan

a. Konsentrasi logam $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebesar 5ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 20 \text{ ml} \cdot 5 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0.1 \text{ ml (ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O)} + 19.9 \text{ ml (media PDB)}$$

b. Konsentrasi logam $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sebesar 10ppm

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 20 \text{ ml} \cdot 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0.2 \text{ ml (ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O)} + 19.8 \text{ ml (media PDB)}$$

c. Konsentrasi logam $\text{ZnCl}_2\text{H}_2\text{O}$ sebesar 20ppm

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1.1000\text{ppm} = 20\text{ml}.20\text{ppm}$$

$$V_1 = 0.4\text{ml (ZnCl}_2\text{H}_2\text{O)} + 19.6 \text{ ml (media PDB)}$$

d. Konsentrasi logam $\text{ZnCl}_2\text{H}_2\text{O}$ sebesar 50ppm

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1.1000\text{ppm} = 20\text{ml}.50\text{ppm}$$

$$V_1 = 1\text{ml (ZnCl}_2\text{H}_2\text{O)} + 19\text{ml (media PDB)}$$

e. Konsentrasi logam $\text{ZnCl}_2\text{H}_2\text{O}$ sebesar 100ppm

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1.1000\text{ppm} = 20\text{ml}.100\text{ppm}$$

$$V_1 = 2\text{ml (ZnCl}_2\text{H}_2\text{O)} + 18 \text{ ml (media PDB)}$$

f. Konsentrasi logam $\text{ZnCl}_2\text{H}_2\text{O}$ sebesar 200ppm

$$V_1.M_1 = V_2.M_2$$

$$V_1.1000\text{ppm} = 20\text{ml}.200\text{ppm}$$

$$V_1 = 4\text{ml (ZnCl}_2\text{H}_2\text{O)} + 16\text{ml (media PDB)}$$

Lampiran 3

Uji toleransi $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

a. Berat Kering Fungi



Isolat Tumbuh
pada media PDB,
di shaker 150 rpm
selama 7 hari



Disaring



Dioven (80°C ,
10 jam)



Ditimbang

Tabel 1. Berat kering 11 isolat fungi endofit

Kode Isolat	0ppm	5ppm	10ppm	20ppm	50ppm	100ppm	200ppm	300ppm	400ppm	500ppm	600ppm	700ppm
L1U1A	0.21445	0.20845	0.18635	0.11625	0.06235	0.05175						
L1U1C	0.11195	0.10115	0.07485	0.0509	0.04295	0.0326						
L1U1D	0.21805	0.20955	0.19855	0.1677	0.1053	0.0729						
L1U2A	0.21725	0.2155	0.19705	0.14495	0.0995	0.06835						
L1U2B	0.20585	0.17335	0.1273	0.107	0.082	0.05615						
L1U2C	0.27575	0.2412	0.17925	0.14315	0.10685	0.0872						
L2U1A	0.2577	0.25225	0.249	0.2376	0.19035	0.1338	0.0796	0.0777	0.08555	0.0712	0.05745	0.0331
L2U1B	0.24185	0.21535	0.2118	0.1925	0.1157	0.0944	0.0737	0.06355	0.0098			
L2U3A	0.13645	0.11335	0.1125	0.0912	0.072	0.04095						
L2U3B	0.17485	0.15385	0.1116	0.0834	0.0301	0.01755						
L3U3A	0.22375	0.2089	0.18515	0.16705	0.13965	0.0823						

b. Indeks Toleransi

Contoh perhitungan indeks toleransi pada isolat L2U1A dengan konsentrasi 100 ppm

$$TI = \frac{DW \text{ perlakuan}}{DW \text{ kontrol}} \times 100\%$$

$$TI = \frac{0,1338}{0,2577} \times 100\% = 51,9208\%$$

Tabel 2. Nilai Indeks Toleransi (TI) 11 isolat fungi endofit

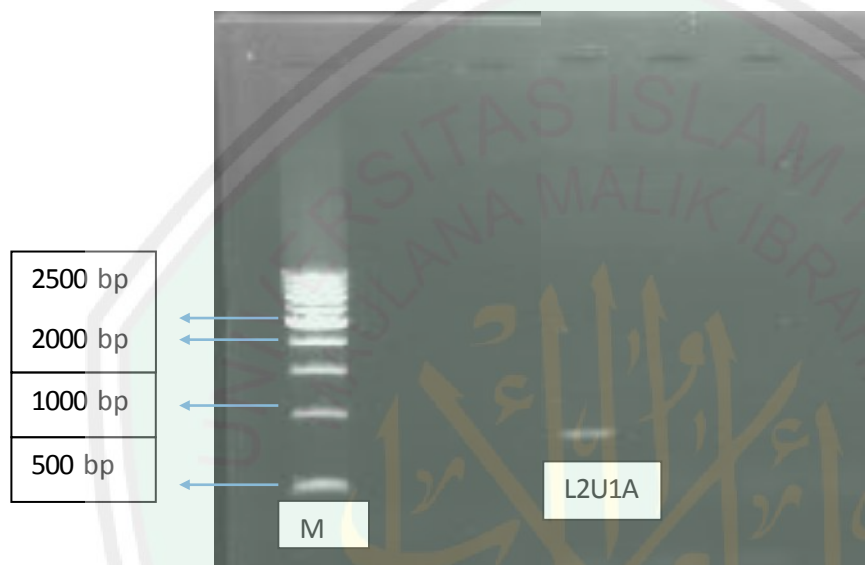
Kode isolat	5ppm	10ppm	20ppm	50ppm	100ppm	200ppm	300ppm	400ppm	500ppm	600ppm	700ppm
L1U1A	97.20215	86.89671	54.20844	29.07438	24.1315						
L1U1C	90.35284	66.86021	45.46673	38.36534	29.12014						
L1U1D	96.10181	91.0571	76.90897	48.29168	33.4327						
L1U2A	99.19448	90.70196	66.72037	45.79977	31.46145						
L1U2B	84.2118	61.84115	51.9796	39.83483	27.27714						
L1U2C	87.47053	65.00453	51.91296	38.74887	31.62285						
L2U1A	97.88514	96.62398	92.20023	73.86496	51.92084	33.1975	30.8886	30.1513	27.62903	22.29336	12.84439
L2U1B	89.0428	87.57494	79.59479	47.83957	39.03246	30.47343	26.27662	4.052098			
L2U3A	83.07072	82.44778	66.83767	52.76658	30.01099						
L2U3B	87.98971	63.82614	47.69803	17.21476	10.03717						
L3U3A	93.36313	82.7486	74.65922	62.41341	36.78212						

Lampiran 4

Isolasi DNA fungi endofit akar *Tridax procumbens* berhasil dilakukan dengan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1987) dengan modifikasi. Berdasarkan uji kuantitatif menggunakan nanodrop, dengan nilai kemurnian 1.09.



Uji kualitatif DNA genom fungi endofit terpilih memiliki panjang 686 base pair. Isolat tersebut memiliki band yang jelas pada rentan panjang 500-1000 bp.



Gambar 4.1. Hasil visualisasi PCR dengan menggunakan Gel doc (100 volt, 30 menit). M: Marker, L2U1A: isolat

Lampiran 5

Hasil Sequencing

GGGCCCCGGTCGCTCTTTGTCTTTATGGCCCCCCTCCCACCCGTGACTATTG
TACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGGGGGCG
ACTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACCCTGTTC
TGAAAGCTTGCAATCTGAGTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAACCTTTCAA
CAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCT
GCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCGGGG
GACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTTCGAGCGTAT
GGGGCTTCGTCTTCCGCTCCGTAGGCCCGGCCGGCGCCCGCCGACGCATT
TATTTGCAACTTGTTTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACC
CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGAAGACAAT

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident Accession
☐	Aspergillus terreus strain 1B61 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and	1033	1033	96%	0.0	99.65% KF572455.1
☐	Aspergillus terreus isolate C23-3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1027	1027	95%	0.0	99.64% MG707631.1
☐	Aspergillus terreus strain 4784 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; a	1027	1027	95%	0.0	99.64% MH465254.1
☐	Aspergillus nomius strain KG_21 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	1027	1027	95%	0.0	99.64% MG647853.1
☐	Aspergillus tubingensis strain MSEF76 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete seq	1027	1027	95%	0.0	99.64% KT310980.1
☐	Aspergillus terreus isolate A6a 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spac	1027	1027	96%	0.0	99.47% JN634877.1
☐	Aspergillus tubingensis strain ATU-KSU09 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete	1027	1027	95%	0.0	99.64% HM753602.1
☐	Aspergillus terreus strain AT-KSU309 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequ	1027	1027	95%	0.0	99.64% HM753600.1
☐	Aspergillus terreus isolate S21 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; a	1024	1024	95%	0.0	99.64% MG654690.1
☐	Aspergillus terreus strain AKF2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1024	1024	96%	0.0	99.12% KJ685810.1
☐	Aspergillus terreus isolate PKU F22 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S rib	1024	1024	95%	0.0	99.64% KC113303.1
☐	Aspergillus terreus var. terreus strain CBS 132159 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,	1022	1022	95%	0.0	99.47% MH865977.1
☐	Aspergillus terreus strain CBS 129264 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and interna	1022	1022	95%	0.0	99.47% MH865311.1
☐	Aspergillus terreus strain F-2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcrib	1022	1022	95%	0.0	99.47% MG256022.1
☐	Aspergillus terreus isolate PT2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr	1022	1022	95%	0.0	99.47% MH748155.1
☐	Aspergillus terreus strain OUC-MDZ5136 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inter	1022	1022	95%	0.0	99.47% MK351266.1
☐	Aspergillus niger isolate Z11 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; an	1022	1022	95%	0.0	99.47% MH237648.1



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp / Faks. (0341) 552933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Ina Aodiyah
NIM : 15620074
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil T.A 2019
Pembimbing : Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
Judul Skripsi : Uji Toleransi dan Identifikasi Fungi Endofit Akar *Tridax procumbens* dari Tanah Pertambangan Minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro, Jawa Timur.

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	15 Januari 2019	Konsultasi Judul Penelitian	1. <i>[Signature]</i>
2.	30 Januari 2019	Konsultasi Judul Penelitian	2. <i>[Signature]</i>
3.	5 Maret 2019	Konsultasi BAB I	3. <i>[Signature]</i>
4.	11 Maret 2019	Konsultasi BAB I, II, III	4. <i>[Signature]</i>
5.	13 Maret 2019	ACC Proposal	5. <i>[Signature]</i>
6.	3 Juli 2019	Konsultasi BAB IV	6. <i>[Signature]</i>
7.	2 Agustus 2019	Konsultasi BAB IV, V, dan Daftar Pustaka	7. <i>[Signature]</i>
8.	6 Agustus 2019	ACC Skripsi	8. <i>[Signature]</i>

Malang, 2 September 2019

Pembimbing Skripsi,

[Signature]

Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
NIP. 19650509 199903 2 002

Ketua Jurusan,

[Signature]

Romaidi, M.Si., D.Sc
NIP. 19810201 200901 1 019



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : Ina Aodiyah
NIM : 15620074
Program Studi : Biologi
Semester : Ganjil T.A 2019
Pembimbing : Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si
Judul Skripsi : Uji Toleransi dan Identifikasi Fungi Endofit Akar *Tridax procumbens* dari Tanah Pertambangan Minyak Desa Wonocolo, Bojonegoro, Jawa Timur.

NO.	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	11 Maret 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB I dan II	1.
2.	15 Maret 2019	ACC Integrasi BAB I dan II	2.
3.	31 Juli 2019	Konsultasi Integrasi Ayat BAB IV	3.
4.	6 Agustus 2019	ACC Integrasi BAB IV	4.

Malang, 2 September 2019

Pembimbing Skripsi,

Ketua Jurusan,

Dr. Ahmad Barizi, M.A.

NIP. 19731212 199803 1 008

Romaidi M.Si., D.Sc.

NIP. 19810201 200901 1 019