

## Identifikasi Mikroorganisme Kontaminan Pada Kultur Jaringan Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.)

### *Microorganism Identification of Contaminant on Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Tissue Culture*

Muhammad Ilham\*, Ernayunita, dan Hernawan Yuli Rahmadi

**Abstrak** Salah satu kendala kultur jaringan kelapa sawit yaitu adanya risiko kontaminasi mikroorganisme pada setiap prosesnya. Kontaminasi mikroorganisme pada proses kultur dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan bahkan kegagalan tumbuh. Jenis – jenis kontaminasi yang sering ditemukan dalam kultur jaringan adalah bakteri dan jamur. Mikroorganisme kontaminan dapat tumbuh dengan baik pada media kultur jaringan karena terdapat kandungan nutrisi didalamnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis kontaminasi mikroorganisme pada kultur jaringan kelapa sawit sehingga dapat ditentukan pengendalian kontaminasi yang sesuai dan tepat sasaran. Metode penelitian menggunakan metode *purposive sampling* yang meliputi kriteria sampel, seleksi sampel, verifikasi sampel yang selanjutnya dilakukan isolasi, pemurnian, serta identifikasi dan pengamatan mikroskopik/makroskopik. Hasil penelitian menunjukkan dua genus teridentifikasi dari isolat fungi yaitu *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. melalui pengamatan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Selain itu, isolat bakteri teridentifikasi 4 isolat Gram negatif dan 1 isolat Gram positif melalui uji gram menggunakan KOH 3%. Kelimpahan tertinggi isolat bakteri terdapat pada sampel 3 dengan nilai  $2,9 \times 10^5$  CFU/mL. Morfologi mikroskopik teridentifikasi bulat (*coccus*), batang (*bacillus*) dan spiral. Pengendalian mikroorganisme dilakukan dengan penggunaan antibiotik yaitu *Tetracycline*, *Ciprofloxacin*, dan *Kanamycin* serta penggunaan antifungal yaitu fluconazole dan ketoconazole. Pencegahan

mikroorganisme dilakukan dengan sterilisasi alat dan bahan, pemilihan zat sterilan, teknik sterilisasi, kondisi ruang kultur yang bersih, pemantauan dan pemisahan kultur terkontaminasi secara berkala.

**Kata Kunci:** identifikasi, kultur jaringan, kontaminasi, mikroorganisme.

**Abstract** The issue of oil palm tissue culture is that the risk of microorganism contamination in its every process. Microorganism contamination can hinder the growth and development of explants, even causing them to fail to grow. The mostly types of contamination found in tissue culture are bacteria and fungi. Contaminating microorganisms can thrive in tissue culture media due to the presence of nutrients. This research aims to determine the type of contamination in oil palm tissue culture and, if necessary in the future, determine the use of antibiotics as a preventive measure against contamination in the tissue culture process. The research methods used purvosive sampling which included sample criteria, sample selection, sample verification followed by isolation, purification, and microscopic/macrosopic observation. The results revealed two genera from fungal isolates, namely *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. through microscope observation with 1000x magnification. Additionally, four bacterial isolates were identified as gram-negative and one as gram-positive through the gram test using 3% KOH. The highest abundance of bacterial isolates was shown in sample 3, with  $2,9 \times 10^5$  CFU/mL. Microscopic morphology included round (*coccus*), rod-shaped (*bacillus*), and spiral shapes. To control the microorganisms, antibiotics such as *Tetracycline*, *Ciprofloxacin*, and *Kanamycin*, as well as antifungals like fluconazole and ketoconazole. To prevent microorganisms is managed by sterilizing tools and materials, selecting sterilitant

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Muhammad Ilham\*(✉)  
Pusat Penelitian Kelapa Sawit  
Jl. Brigjen Katamso No. 51 Medan 20158 Indonesia  
Email: ilhambawazier04@gmail.com

*substances, sterilization techniques, clean culture room conditions, monitoring and periodically removing contaminated cultures.*

**Keywords:** *contamination, identification, microorganism, tissue culture.*

## PENDAHULUAN

Kultur jaringan tanaman kelapa sawit merupakan suatu teknik perbanyak sel, jaringan atau organ tanaman yang diinduksi pada media buatan secara aseptis. Kultur jaringan tidak lepas dengan risiko kontaminasi yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan sehingga dapat menyebabkan keterlambatan pertumbuhan. Kontaminan berupa mikroorganisme merupakan suatu faktor pembatas dalam kegiatan kultur jaringan. Oleh karena itu, kontaminasi menjadi salah satu kendala dalam proses kultur jaringan. Jenis -jenis kontaminan yang paling umum ditemukan dalam kultur jaringan yaitu bakteri dan jamur maupun mikroorganisme lain seperti khamir, kapang, tungau, maupun *thrips* (Cobrado & Fernandez, 2016).

Kontaminasi berasal dari sumber yang beranekaragam (internal maupun eksternal) diantaranya sumber eksplan yang sudah terkena penyakit, organisme kecil yang masuk ke dalam media kultur, peralatan kultur seperti botol, pinset, *scalpel* yang kurang steril, lingkungan kerja, serta ruang kultur yang belum memenuhi standar (Ray & Ali, 2017; Wati *et al.* 2020). Peristiwa terjadinya kontaminasi berkaitan dengan kondisi sirkulasi udara, kebersihan ruangan, serta kebersihan operator (Ogunsanwo, 2007). Mikroorganisme penyebab kontaminasi mampu tumbuh dengan baik pada media kultur jaringan karena media kultur jaringan mengandung nutrisi yang dapat diserap baik oleh mikroorganisme (Omamor *et al.*, 2007). Pertumbuhan mikroorganisme memiliki kemampuan yang dapat mendominasi tanaman didalam botol, hilangnya ketersediaan oksigen, serta bersaing mendapatkan nutrisi (Orlikowska *et al.*, 2017). Selain itu, beberapa dari mikroorganisme kontaminan mampu menghasilkan senyawa fitotoksin yang mengakibatkan kematian kultur, nekrosis pada jaringan, hingga mengurangi proliferasi tunas dan perakaran (Kane *et al.*, 2003).

Pengelolaan kontaminan pada kultur jaringan tanaman kelapa sawit memiliki tantangan khususnya

kontaminan bakteri endofit yang resisten terhadap desinfektan. Sebagai usaha mengurangi risiko kontaminan dapat dilakukan penambahan antibiotik untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut penelitian Eziashi *et al.*, (2014), antibiotik bersifat menghambat aktivitas metabolisme bakteri (bakteriostatik) yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri namun akan hilang tingkat keefektivitasannya setelah tidak dilakukan penambahan antibiotik kembali. Antibiotik memiliki mekanisme kerja yang berbeda yakni bakterisid dan bakteriostatik. Antibiotik yang tergolong bakterisid meliputi *rifampicin*, *vancomycin* dan penisilin, sedangkan yang tergolong bakteriostatik adalah *erythromycin* dan *trimethoprim*. Sifat bakterisid dan bakteriosid sangat besar dipengaruhi dosis antibiotik. Penggolongan antibiotik berdasarkan spektrum kerja terbagi atas dua, yaitu spektrum luas dan spektrum sempit, golongan antibiotik yang termasuk dalam spektrum luas meliputi ampicillin dan rifampicin, yang termasuk dalam spektrum sempit adalah *erythromycin*, *streptomycin* dan *kanamycin*.

Penelitian mengenai identifikasi mikroorganisme khususnya jamur kontaminan pada eksplan kultur jaringan tanaman anggrek alam (*Bromheadia finlaysoniana* (Lind.) Miq.), jamur kontaminan terbanyak ditemukan pada eksplan daun dengan kelimpahan sebanyak 28 koloni dengan karakteristik makroskopik dan mikroskopik ditemukan jenis *Rhizoctonia* sp. dan *Mucor* sp. (Andriani & Heriansyah, 2021). Selain itu, jenis jamur kontaminan pada kultur jaringan kalus *Catharanthus roseus* ditemukan beberapa genus jamur, antara lain *Aspergillus*, *Rhizopus* dan *Mucor* (Oratmangun *et al.*, 2017). Penelitian molekuler menggunakan analisis sekuen parsial gen 16S rRNA telah dilakukan oleh Nadha *et al.* (2012), dua bakteri yang mengkontaminasi yaitu *Pantoea agglomerans* dan *Pantoea ananatis*. Penelitian yang telah dilakukan pada tanaman kelapa sawit mengenai identifikasi mikroorganisme telah dilakukan namun hanya sebatas pengamatan makroskopik. Menurut Pratiwi *et al.* (2021), bahwa jenis kontaminan yang banyak ditemukan dalam kultur jaringan kelapa sawit yaitu bakteri dan jamur secara makroskopik. Hal tersebut didukung dengan munculnya kontaminasi jamur sebesar 60% dan kontaminasi bakteri sebesar 40% pada media tanam.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis kontaminan pada kultur jaringan tanaman kelapa sawit

(*Elaeis guineensis* jacq.) sehingga dapat ditentukan pencegahan maupun pengendalian yang sesuai dalam pencegahan kontaminasi dalam kultur jaringan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan identifikasi makroskopik dan mikroskopik kontaminan yang muncul pada kultur tanaman kelapa sawit.

## BAHAN DAN METODE

### 1. Koleksi sampel sumber isolat

Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode purposive sampling yang merupakan teknik berdasarkan kriteria yang dipilih sesuai dengan tujuan penelitian yang dilakukan. Menurut Arikunto, (2010) purposive sampling dilakukan dengan cara mengambil subjek yang didasarkan strata yakni secara acak dengan melibatkan kriteria sampel (jenis bakteri/jamur, kondisi lingkungan dalam kultur, dan sifat fisiologis), seleksi sampel (sampel yang sudah ditetapkan sesuai kriteria), dan verifikasi sampel (meninjau sampel untuk memastikan sampel sesuai dengan kriteria). Jenis sampel yang digunakan meliputi hasil kultur jaringan tanaman kelapa sawit yang memasuki fase perkembangan embrio kelapa sawit yang terkontaminasi mikroorganisme. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 10 botol yang diulang sebanyak 3 kali.

### 2. Isolasi dan identifikasi sumber isolat jamur

Teknik isolasi jamur yang dilakukan yaitu memilih koloni jamur menggunakan pipet steril, selanjutnya transfer koloni jamur yang telah dipilih ke media pertumbuhan jamur dengan cara gores (*streaking*). Medium pertumbuhan yang digunakan yaitu Potato Dextrose Agar (PDA) yang mengandung *chloramphenicol* (100 mg/L), kemudian diautoklaf pada suhu 121°C, 15 Psi selama 15 menit. Setelah di sterilisasi, dituang pada cawan petri Ø 99 mm. Sampel pada medium PDA diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari, diamati pertumbuhan koloni jamur yang tumbuh, kemudian diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi, serta dilakukan pengamatan mikroskopis (Arifah et al.,

2023).

### 3. Isolasi sumber isolat bakteri

Pengambilan sampel bakteri meliputi pemilihan koloni bakteri menggunakan ujung pipet steril, selanjutnya sampel kontaminan bakteri masing-masing disuspensi dengan 10 mL akuades steril, kemudian dilakukan teknik *serial dilution* hingga pengenceran ke  $10^4$  CFU/mL. Selanjutnya masing-masing sampel pada pengenceran 103 CFU/mL hingga  $10^4$  CFU/mL diambil 100  $\mu$ L dan dilakukan dengan teknik *spread* secara aseptis pada media *Nutrient Agar* (NA) steril. Sampel pada media NA kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari, dan diamati pertumbuhan koloni bakteri yang tumbuh untuk dilanjutkan ke tahap pemurnian bakteri. Tujuan dilakukan pengenceran yaitu agar diperoleh isolat yang tidak begitu padat dan mewakili semua jenis bakteri yang terdapat pada sampel (Marzuki et al., 2014).

### 4. Pemurnian bakteri (*Bacterial purification*)

Pemurnian isolat bakteri dilakukan dengan memindahkan bakteri menggunakan metode garis (*streak plate*) pada media NA steril sehingga dapat diperoleh biakan murni. Isolat bakteri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 hari, dan diamati pertumbuhan koloni bakteri (Ed-Har et al., 2017).

### 5. Kelimpahan bakteri

Kelimpahan bakteri dihitung dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) yang merupakan metode pendugaan jumlah mikroorganisme. Koloni bakteri dipilih dari cawan petri dari satu pengenceran. Perhitungan jumlah koloni dari 25-200 koloni menggunakan rumus sebagai berikut menurut . Perhitungan koloni bakteri dilakukan untuk mengetahui jumlah koloni bakteri yang terdapat pada suatu media (Rosmania & Yanti, 2020).

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{jumlah koloni bakteri}}{\text{pengenceran}} \times 10^6$$

## 6. Identifikasi dan pengamatan mikroskopik

Proses identifikasi dengan pengujian gram menggunakan pengujian KOH 3%. Pengujian ini merupakan metode untuk mengidentifikasi dan menentukan jenis dominan bakteri yang aktif dengan ditandai adanya lendir (Edwin, 2011). Pewarnaan gram menggunakan Safranin O 1% dalam alkohol 70% dan uji dibuat apusan kemudian didiamkan lalu dicuci menggunakan akuades dan dikeringkan, kemudian ditutup dengan *coverglass*.

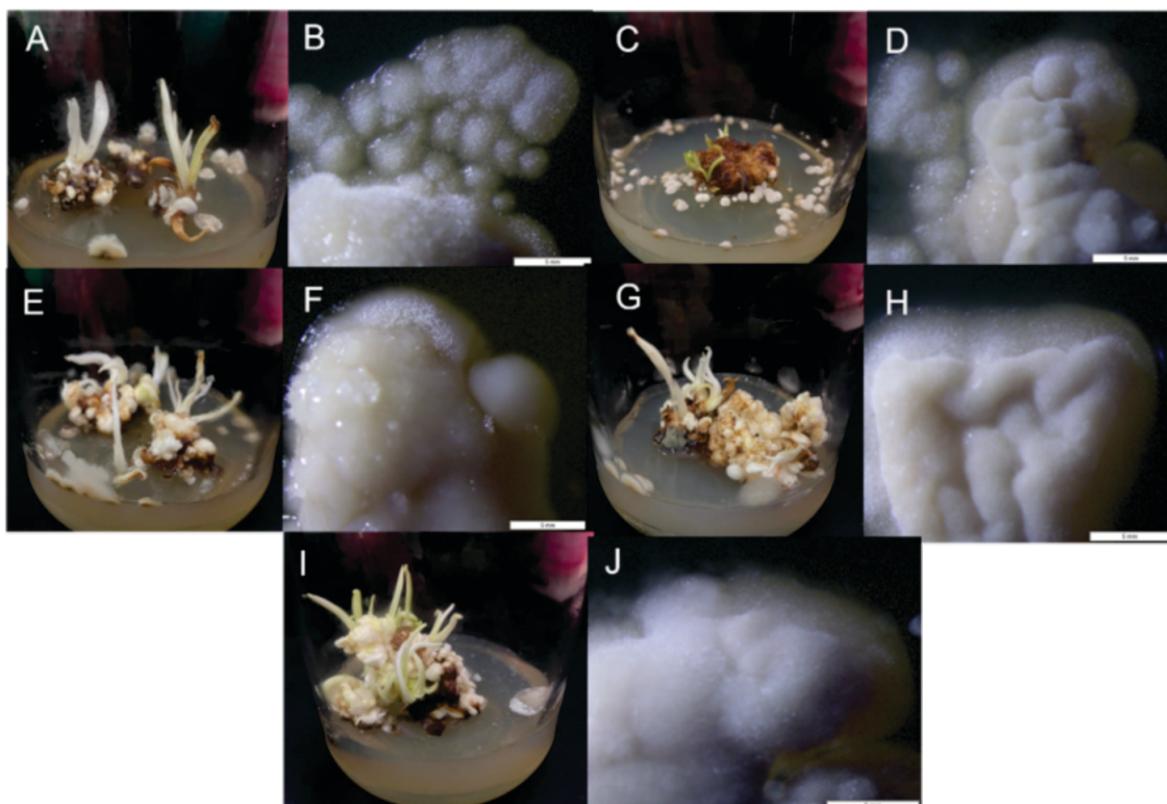
Pengamatan mikroskopik dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000X. Identifikasi di deskripsikan secara morfologi mengacu pada beberapa pustaka Gandjar *et al.* (1999), (Barnett &

Hunter 1998; Zheng *et al.* 2007; Baquião *et al.* 2013; Samson *et al.* 2014; Visagie *et al.* 2014; Prakash and Bhargava 2016, Frisvad *et al.* 2019).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Jamur kontaminan yang teridentifikasi

Identifikasi morfologi dilakukan dengan melalui pengamatan berdasarkan karakteristik secara makroskopik dan mikroskopik. Morfologi isolat fungi pada kultur jaringan embrio kelapa sawit dapat dilihat pada Gambar 1 yang kemudian dilanjutkan pengamatan karakteristik makroskopis pertumbuhan sumber isolat fungi dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Karakteristik morfologi lima isolat fungi pada kultur jaringan embrio kelapa sawit. Keterangan: Kontaminasi media kultur jaringan (A,C,E,G,I), Isolat fungi pada media PDA (B,D,F,H,J)

*Figure 1. Five morphological characteristics of fungal isolates in oil palm embryo tissue culture. Annotation: Media contaminant of tissue culture (A,C,E,G,I), Fungi isolate on PDA (B,D,F,H,J).*

Tabel 1. Karakteristik makroskopis isolat jamur kontaminan pada kultur jaringan kelapa sawit

Table 1. Macroscopic characteristics of contaminant fungal isolates in oil palm tissue culture

Kontaminan	Warna	Tekstur	Koloni	Miselium	Bentuk	Elevasi
1	Putih keabuan	Kasar	Menyebar	Putih	<i>Filamentous</i>	<i>Raised</i>
2	Putih	Kasar	Menyebar	Putih	<i>Circular</i>	<i>Convex</i>
3	Putih keabuan	Kasar	Menyebar	Putih	<i>Filamentous</i>	<i>Raised</i>
4	Putih keabuan	kasar	Menyebar	Putih	<i>Irregular</i>	<i>Umbonate</i>
5	Putih keabuan	Kasar	Menyebar	putih	<i>Irregular</i>	<i>Umbonate</i>

Kontaminasi fungi yang tumbuh pada media dikelompokan berdasarkan warna koloni, tekstur koloni, miselium, bentuk koloni, serta elevasi koloni. Terdapat lima kelompok fungi yang memiliki kesamaan karakter makroskopik. Kontaminan fungi yang tumbuh didominasi dengan warna putih keabuan dengan bentuk permukaan kasar. Selain dengan penelitian (Oratmangun *et al.*, 2017), bahwa jamur kontaminasi tumbuh didominasi dengan warna koloni putih dan abu-abu. Karakteristik fungi pada kultur jaringan secara makroskopis sebagian besar berasal dari kelas deutromycetes, zygomycetes dan euotiomycetes. Kelas deutromycetes bercirikan makroskopik dengan warna koloni putih, abu-abu hingga coklat kehitaman dengan arah pertumbuhan simetris. Kelas zygomycetes bercirikan makroskopik dengan warna koloni putih, abu-abu, hijau dan arah pertumbuhan menyebar (Abdullah, 2020). Kelas

euotiomycetes dapat bersifat saprotrofik, biotrofik, ektomikoriza, dan endofit. Memiliki struktur mirip dengan kantung (asci) yang mengandung akrospora dalam tubuh buah tertutup (ascocarp) atau spora yang bulat (Chen, 2015).

Hasil pengamatan karakter mikroskopis isolat fungi kontaminan pada kultur jaringan kelapa sawit teridentifikasi yaitu *Penicillium* sp. dapat dilihat pada Gambar 2. Berikut klasifikasi *Penicillium* bedasarkan tingkatan taksonominya menurut Link, (1909):

Kingdom : Fungi

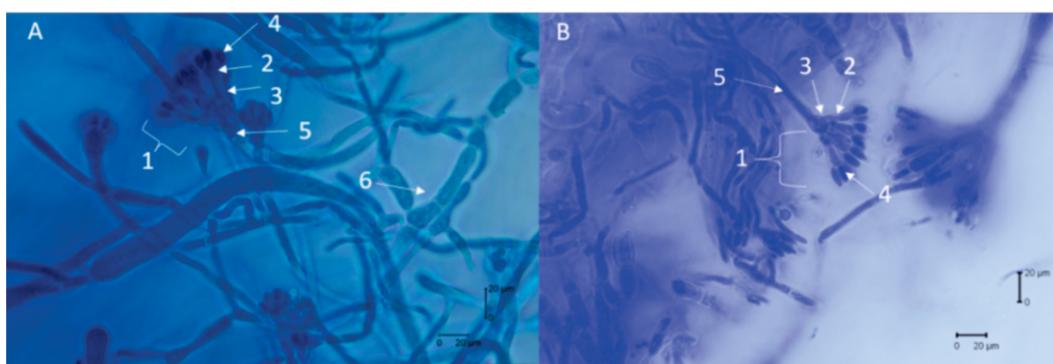
Division : Ascomycota

Class : Eurotiomycetes

Order : Eurotales

Family : Aspergillaceae

Genus : *Penicillium*



Gambar 2. Pengamatan mikroskopis isolat fungi (*Penicillium* sp.) yang teridentifikasi pada kultur jaringan. Keterangan: 1. Konidium; 2. Fialid; 3. Metulae; 4. Konidia; 5. Konidiophor; 6. Septat. Perbesaran 1000x, Bar= 20  $\mu$ m.

Figure 2. Microscopic observation identified of contaminant fungal isolates (*Penicillium* sp.). Description: 1. Conidium; 2. Phialide; 3. Metulae; 4. Conidia; 5. Conidiophores; 6. Septat. Magnification 1000X, Bar=20  $\mu$ m.

Genus *Penicillium* sp. yang teridentifikasi memiliki struktur hifa hialin (transparan) dan bersepta, memiliki konidiofor yang bercabang, konidium, serta memiliki fialid dan metulae (Gambar 2A-B, Tabel 4 dan 5). Penelitian ini sejalan dengan penelitian (Putu et al., (2018), dimana genus *Penicillium* yang teramati memiliki konidia dan konidiofor yang berdinding halus, konidiofor bercabang, dan memiliki metulae serta fialid. Menurut penelitian Anggraeni & Usman, (2015), bahwa isolat jamur kontaminan *Penicillium* sp. memiliki warna putih yang seiring berjalannya waktu akan mengalami perubahan warna menjadi biru kehijauan, abu-abu kehijauan, kuning, bahkan kemerahan. Secara mikroskopis isolat ini memiliki hifa yang transparan, konidia bulat, sel tunggal, serta terdapat sekelompok fialid.

Genus *Aspergillus* sp. yang teramati memiliki warna putih keabuan hingga putih kehitaman dengan dasar krem. Identifikasi sejalan dengan penelitian Putu et al., (2018), dimana genus *Aspergillus* memiliki permukaan koloni berwarna hijau kekuningan dengan dasar putih, kemudian menjadi putih dengan hifa aerial berwarna *apple green* pada hari ke-6. Secara

mikroskopis genus *Aspergillus* memiliki ciri hifa hialin dan berseptat, memiliki vesikel berbentuk bulat, konidium, konidiofor, dan fialid (Gambar 3A-C, Tabel 1-3). Klasifikasi *Aspergillus* berdasarkan tingkatan taksonominya (Mischeli, 1729).

Kingdom : Fungi

Division : Ascomycota

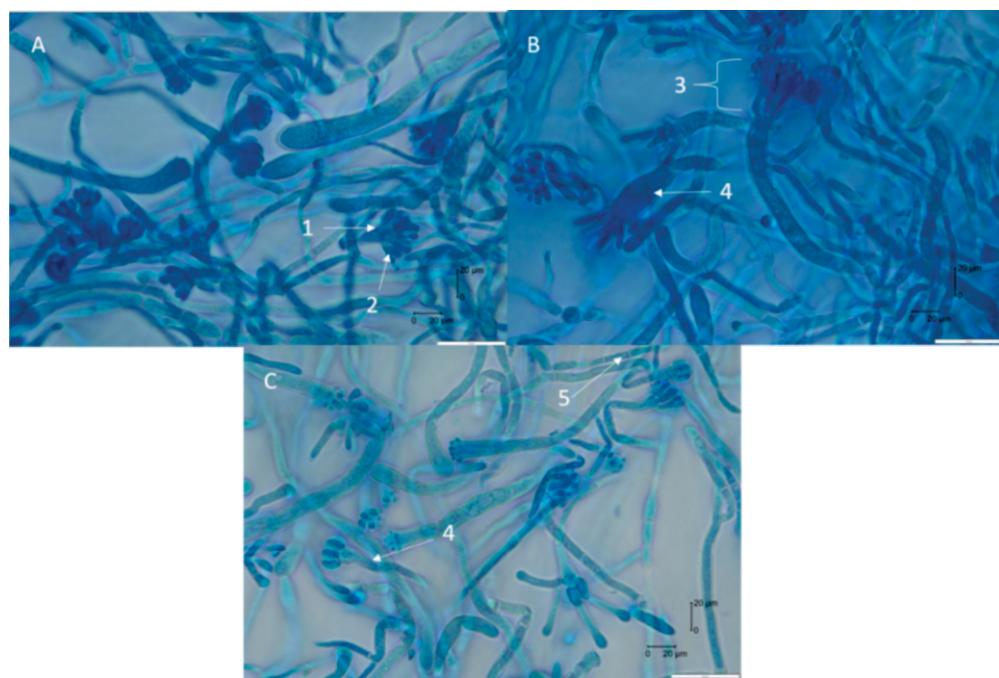
Class : Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Trichocomaceae

Genus : Aspergillus

Fungi *Aspergillus* sp. memiliki konidiofor yang berbentuk batang (Natassya et al., 2013). Bagian vesikula terdapat fialid yang merupakan salah satu faktor penyusun dari vesikula. Konidiofor pada cendawan *Aspergillus* sp. berasal dari *foot cell* yang dimiliki oleh cendawan tersebut, dimana *foot cell* merupakan organ miselium pada cendawan yang berdinding tebal, membengkak sehingga akan berkembang menjadi konidiofor (Mawarni et al., 2021).



Gambar 3. Pengamatan mikroskopis isolat fungi (*Aspergillus* sp.) yang teridentifikasi pada kultur jaringan. Keterangan: 1. Vesikula; 2. Fialid; 3. Konidium; 4. Konidiofor; 5. Septat. Perbesaran 1000x; Bar = 20 µm.

Figure 3. Microscopic observation identified of contaminant fungal isolates (*Aspergillus* sp.). Annotation: 1. Vesicles; 2. Phialide; 3. Conidium; 4. Conidiophores; 5. Septat. Magnification 1000X, Bar=20 µm.

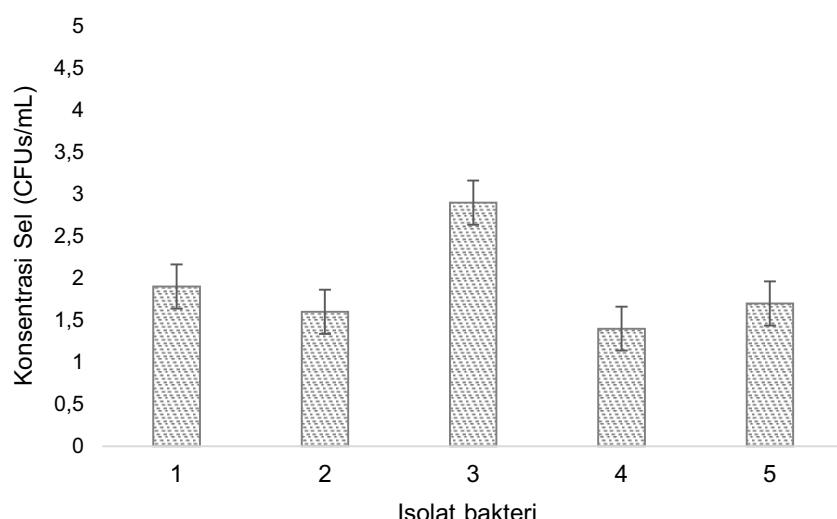
Menurut Noerfitryani & Hamzah, (2018), bahwa ciri-ciri makroskopik cendawan *Aspergillus* pada media PDA yakni memiliki tekstur seperti tepung, hifa berwarna putih dan memiliki zonasi konsentris. Adapun ciri-ciri mikroskopiknya yaitu konidia berbentuk bulat, dengan hifa beraspera dan hialin. Hasanah (2017), menambahkan *Aspergillus* merupakan organisme mikroskopis dengan inti sel (eukariotik), salah satu dari makhluk hidup yang sering muncul sebagai kontaminan pada berbagai substrat di wilayah tropis dan subtropis. Secara makroskopis, *Aspergillus* dapat dikenali melalui ciri-ciri koloninya yang berwarna hijau atau putih saat masih muda, terdapat hifa yang beraspera, konidia, dan konidiofor. Secara mikroskopis, *Aspergillus* dapat dikenali melalui bentuk hifa yang beraspera dan miselium yang bercabang.

Pengendalian mikroorganisme fungi *Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp. dapat dilakukan dengan penambahan zat antifungal. Anti fungal merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan serta aktivitas metabolisme fungi. Bahan antifungal yang digunakan harus optimum dalam membunuh jamur (fungisid) dan menghambat pertumbuhan jamur (fungistatik) pada substrat (Dewi et al., 2017). Salah satu anti fungal yang dapat digunakan dalam menghambat pertumbuhan jamur yaitu ketoconazole

dan fluconazole. Ketoconazole merupakan agen anti fungal sistemik yang mengganggu sintesis membran sel jamur serta aktivitas enzim tertentu, sedangkan fluconazole adalah anti fungal golongan azole yang efektif untuk penanganan infeksi jamur yang bersifat fungistatik sistemik. Penelitian Msogoya et al. (2012), membuktikan bahwa antifungal fluconazole dengan konsentrasi 200 mg/L secara efektif menekan pertumbuhan fungi *Penicillium* sp. dan *Aspergillus* sp. namun tidak menekan pertumbuhan fungi *Fusarium* sp. Selain itu, ketoconazole pada konsentrasi 200 mg/L efektif melawan pertumbuhan fungi *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., dan *Penicillium* sp. dalam kultur jaringan pisang. Cosma & Petrus-Vancea, (2017), menambahkan bahwa penambahan fluconazole 50 mg/L pada media MS (1962) dan Gamborg (1968) dapat menghambat pertumbuhan jamur dalam kultur *Triticosecale wittmack*.

## 2. Karakterisasi bakteri kontaminan kultur jaringan

Identifikasi morfologi bakteri sama halnya dilakukan dengan melalui pengamatan berdasarkan karakteristik secara makroskopik dan mikroskopik. Hasil analisis terhadap kelimpahan koloni bakteri pada media NA dengan waktu inkubasi 24-48 jam dapat dilihat pada Grafik 1.



Grafik 1. Konsentrasi sel pada beberapa jumlah sampel bakteri pada fase embrio dalam kultur jaringan kelapa sawit

*Graphic 1. The cell concentration of several bacterial samples in oil palm embryo phase cultures*

Berdasarkan Grafik 1, diperoleh hasil nilai rata-rata kelimpahan sel bakteri berdasarkan konsentrasi sel yang dihitung. Nilai kelimpahan bakteri CFU/ml dengan kelimpahan tertinggi pada sampel 3 sebesar  $2,9 \times 10^5$  CFU/mL (dua kali lipat lebih tinggi) dan kelimpahan terendah terdapat pada sampel 4 yaitu sebesar  $1,4 \times 10^5$  CFU/mL. Kelimpahan bakteri dipengaruhi oleh laju pertumbuhan bakteri. Kelimpahan bakteri pada sampel 1, 2, 4 , dan 5 berada pada fase adaptasi (lag) yang berlangsung dimulai 7-24 jam. Menurut Singh *et al.* (2017), fase ini ditandai dengan peningkatan komponen makromolekul, aktivitas metabolismik dan kerentanan terhadap zat kimia dan faktor fisik, fase ini ditandai dengan belum terjadinya penambahan massa sel atau jumlah selnya.

Kelimpahan tertinggi (sampel 3) diduga terjadi saat bakteri memasuki fase logaritmik (log), fase log ini ditandai dengan pertumbuhan yang signifikan dari sel-selnya. Menurut Sulistijowati (2012), fase log mendeskripsikan metabolisme sel untuk membelah diri dengan laju yang konstan menjadi dua kali lipat, aktivitas metabolisme yang konstan, serta keadaan pertumbuhan yang seimbang. Menurut Setyati (2015), kecepatan pertumbuhan pada fase log sangat dipengaruhi oleh media pertumbuhan seperti pH media, kandungan nutrien, kondisi lingkungan termasuk suhu, serta kelembaban udara.

Hasil karakteristik makroskopik isolat bakteri dengan waktu inkubasi yaitu 24-48 jam pada suhu ruang dapat dilihat secara langsung dengan melihat morfologi koloni beserta uji gram bakteri pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik makroskopis isolat bakteri kontaminan pada kultur jaringan kelapa sawit

Table 2. Macroscopic characteristics bacterial isolates contaminant in oil palm tissue cultures

Kontaminan	Bentuk	Tepi	Elevasi	Tekstur	Warna	Ukuran	Gram
1	Bulat	Rata	Datar	Halus	Putih	Kecil	Negatif
2	Bulat	Rata	Datar	Halus	Putih	Besar	Negatif
3	Bulat	Rata	Datar	Halus	Putih	Sedang	Negatif
					Kekuningan		
4	Bulat	Rata	Datar	Halus	Putih	Kecil	Negatif
5	Tidak beraturan	Bergelombang	Datar	Halus	Putih	Besar	Positif

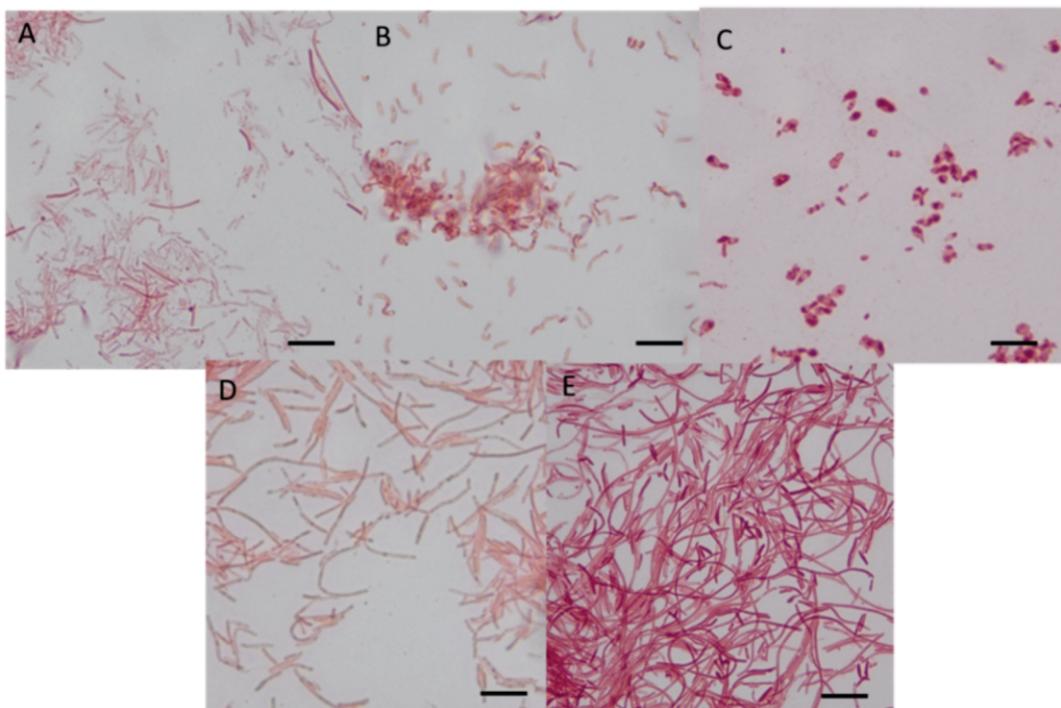
Hasil pengamatan karakter morfologi koloni bakteri udara dari kultur jaringan menunjukkan karakter yang bervariasi. Koloni bakteri yang tumbuh dilihat dan dikarakterisasi berdasarkan beberapa kriteria yang meliputi bentuk koloni bulat/tidak beraturan, tepi koloni rata dan bergelombang, elevasi koloni datar, tekstur koloni halus, warna koloni putih hingga putih kekuningan serta ukuran koloni yang beragam dari kecil, sedang, dan besar. Lay (1994), yang menyatakan bahwa berdasarkan ciri morfologi koloni bakteri dan biakan murni maka dapat dilakukan proses identifikasi jenis-jenis mikroorganisme, namun untuk memperoleh hasil identifikasi yang lebih lengkap mengenai metabolit bakteri maka harus dilanjutkan dengan uji biokimia. Menurut Rahayu & Gumilar,

(2017), uji biokimia bakteri merupakan suatu cara atau perlakuan yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Salah satu metode yang digunakan dalam mengidentifikasi mikroorganisme dalam penelitian ini yakni uji gram dengan KOH 3%. Hasil dari pengujian tersebut, bakteri yang diisolasi dari tanaman kultur jaringan menunjukkan 4 isolat Gram negatif yang ditunjukkan dengan adanya lendir setelah ditetes dengan KOH 3% dan membentuk seperti benang jika ditarik menggunakan ose. Satu isolat menunjukkan Gram positif yang ditandai tidak terbentuk lendir dan menggumpal. Hal ini sesuai dengan penelitian Anasari *et al.*, (2022), Bakteri bersifat gram negatif ditunjukkan

dengan terbentuknya lendir setelah dicampur dengan KOH 3% dan tidak terputus jika ditarik sedangkan gram positif tidak terbentuk lendir dan jika ditarik terputus. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang tebal serta lemak yang tipis, dibandingkan dengan gram negatif memiliki lemak tebal dan berdinding sel tipis yang berada di ruang periplasma. Larutan KOH 3% akan menembus lemak (lipid bilayer) dan membuat sel gram negatif pecah sedangkan gram positif tidak terpengaruh (Chandra & Mani, 2011).

Selanjutnya pewarnaan Gram menggunakan safranin O 1% dalam alkohol 70% (Gambar 4). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan adanya perbedaan sifat Gram pada isolat bakteri. Hasil yang didapatkan yaitu bakteri gram negatif berwarna merah muda

(Gambar 4A-D) dan bakteri Gram positif berwarna merah pekat (Gambar 4E). Berdasarkan hasil pengamatan mikroskopis isolat bakteri kontaminan dapat dilihat pada gambar 4A, B, D, menunjukkan bentuk batang (*basil*), gambar 4C menunjukkan bentuk bulat (*coccus*), dan gambar 4E menunjukkan bentuk spiral. Kemudian, pewarnaan Gram dapat menggunakan reagen pewarnaan Gram bakteri seperti kristal violet, iodin, alkohol, maupun safranin (Rismawati, 2018). Menurut penelitian Wulandari & Purwaningsih, (2019), melaporkan bahwa bakteri yang mempunyai sifat Gram positif akan berwarna biru keunguan (pewarnaan kristal violet) sedangkan bakteri yang mempunyai sifat Gram negatif berwarna merah.



Gambar 4. Perwarnaan Gram isolat bakteri kontaminan kultur jaringan kelapa sawit dengan pemberian Safranin O 1% dalam alkohol 70%. Perbesaran= 1000x; Bar= 20  $\mu$ m.

Figure 4. Gram staining of bacterial isolates contaminants from oil palm tissue culture using 1% Safranin O in 70% alcohol. Magnification= 1000x; Bar= 20  $\mu$ m.

Bakteri Gram positif maupun Gram negatif dapat dicegah pertumbuhannya dengan menggunakan antibiotik. Menurut Pelzcar & Chan (1998), menyatakan bahwa antibiotik merupakan substansi yang diproduksi oleh mikroorganisme sebagai

metabolit sekunder dan dalam konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh organisme lain. Oleh karena itu, antibiotik adalah suatu bahan antimikroba yang dihasilkan oleh organisme hidup (Tkacz, 1992). Salah satu antibiotik yang efektif

melawan bakteri Gram negatif dan Gram positif yaitu *Ciprofloxacin* yang termasuk kedalam kelas fluoroquinolones (FQ) dan diperoleh secara sintetis. Mekanisme antibiotik *Ciprofloxacin* yaitu dengan cara menghambat proses replikasi DNA bakteri (Todar, 2008). FQ mengatur DNA supercoiling bakteri, suatu mekanisme yang diperlukan untuk replikasi, rekombinasi, dan perbaikan DNA, dengan mengikat dan menghambat enzim DNA girase (Hopper et al., 2016). Selain *Ciprofloxacin*, terdapat jenis antibiotik lain yaitu Kanamycin. Kanamycin diisolasi dari *Streptomyces kanamyceticus*, adalah salah satu antibiotik aminoglikosida yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif (Solyev et al., 2023). Penelitian Liang et al. (2019), menunjukkan bahwa penggunaan antibiotik tetracycline mampu mengendalikan pertumbuhan bakteri pada kultur tanaman ceri (*Prunus avium* L.). Konsentrasi terbaik dalam menghilangkan pertumbuhan bakteri yaitu  $>1,0 \mu\text{g/mL}$  dengan meminimalkan efek negatif terhadap eksplan.

Pencegahan kontaminasi mikroorganisme dalam kultur jaringan sangat penting untuk memastikan tanaman dapat berkembang dengan baik. Cara pencegahan yang dapat dilakukan meliputi sterilisasi alat dan bahan sesuai dengan prosedur, pemilihan zat sterilan yang baik seperti alkohol 70% selama 5 menit dan sodium hipoklorit 10% selama 10 menit (Pratiwi et al., 2021), penggunaan bakterisida/fungisida (Setiani et al., 2018), teknik sterilisasi yang tepat, ruang kerja kultur yang bersih, pemantauan hasil kultur, pemisahan kultur yang sudah terkontaminasi (Septiani, et al., 2022). Menurut Kim et al. (2017), penggunaan nanopartikel (NPs) yang mampu menekan mikroorganisme berupa Ag, TiO<sub>2</sub>, dan ZnO. Keefektifan nanopartikel semakin dapat ditingkatkan melalui sinergis dengan kombinasi bahan sterilisasi atau antibiotik.

## KESIMPULAN

Jenis kontaminan isolat fungi pada kultur jaringan tanaman kelapa sawit yang teridentifikasi yaitu genus *Penicillium* sp. dengan struktur hifa hialin (transparan), berseptat, konidiofor bercabang, terdapat konidium, memiliki fialid dan metulae. Genus *Aspergillus* sp. dengan struktur hifa hialin, berseptat, memiliki vesikel berbentuk bulat, konidium, konidiofor, dan fialid. Isolat bakteri pada kultur jaringan tanaman teridentifikasi 4

isolat Gram negatif dan 1 Gram positif berdasarkan uji KOH 3%, dengan kelimpahan tertinggi terdapat pada sampel 3 yaitu  $2,9 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ . Pengendalian kontaminan dapat dilakukan dengan penentuan penggunaan antibiotik seperti *Ciprofloxacin*, *Kanamycin* dan *Tetracycline* dengan memperhatikan dosis dan kondisi tanaman yang digunakan. Selain itu, dapat menggunakan antifungal berupa ketoconazole ataupun fluconazole yang dapat digunakan pada media tanam kultur jaringan. Pencegahan yang dapat dilakukan yaitu sterilisasi alat dan bahan, zat sterilan yang baik, teknik sterilisasi, ruang kultur yang bersih, pemantauan dan pemisahan kultur terkontaminasi secara berkala.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M. K. (2020). Isolasi Identifikasi dan Uji Fitokimia Flavonoid Fungi Endofit dari Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) serta Potensinya Sebagai Antioksidan. Skripsi Diterbitkan Surabaya Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Ampel.
- Anasari, S., Nurdin, M., Agroteknologi, J., Proteksi, J., Fakultas, T., Lampung, U., & Author, C. (2022). Pisang untuk mengendalikan penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum* smith.) tanaman pisang secara in vitro exploration of prokaryote microorganism from banana corm for controlling bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum* Smith. ) ON BANANA PLA. 10(3), 461–468.
- Andriani, D., & Heriansyah, P. (2021). Identifikasi Jamur Kontaminan pada Berbagai Eksplan Kultur Jaringan Anggrek Alam (*Bromheadia finlaysoniana* (Lind.) Miq. Agro Bali: Agricultural Journal, 4(2), 192-199.
- Anggraeni, D. N., & Usman, M. (2015). uji aktivitas dan identifikasi jamur rhizosfer pada tanah perakaran tanaman pisang (*Musa paradisiaca*) terhadap jamur fusarium. BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan), 1(2), 8 9 – 9 8 . <https://doi.org/10.31289/biolink.v1i2.729>
- Arifah, F., Aini, L. Q., & Muhibuddin, A. (2023). Molecular and morphological characterization

- of fungi isolated from nutmeg (*Myristica fragrans*) in North Sulawesi, Indonesia. *Biodiversitas*, 24(1), 441–453. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240151>
- Arikunto, S. 2010. Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktik. Jakarta: Rineka Cipta.
- Barnett H,L & Hunter B,B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th Edition). APS Press, St. Paul.
- Baquião AC, de Oliveira MMM, Reis TA, Zorzete P, Atayde D, & Correa B. (2013). Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section Flavi isolated from Brazil nuts. *Food Chem* 139 (1-4): 1127-1132. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.007.
- Chandra, T. J., & Mani, P. S. (2011). A study of 2 rapid tests to differentiate Gram positive and Gram negative aerobic bacteria. *Journal of Medical and Allied Sciences*, 1(2), 84–85.
- Chen, K. H., Miadlikowska, J., Molnár, K., Arnold, A. E., U'Ren, J. M., Gaya, E., & Lutzoni, F. (2015). Phylogenetic analyses of eurotiomycetous endophytes reveal their close affinities to Chaetothyriales, Eurotiales, and a new order—Phaeomoniellales. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 85, 117-130.
- Cobrado, J., & Fernandez, A. (2016). Common Fungi Contamination Affecting Tissue-cultured Abaca (*Musa textiles* Nee) during Initial Stage of Micropagation. *Asian Research Journal of Agriculture*, 1(2), 1 – 7. <https://doi.org/10.9734/arja/2016/28353>
- Cosma, A. D., & Petruş-Vancea, A. (2017). The effects of antibiotics and antifungals added to plant culture media of *Triticosecale wittmark*. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Biologia*, 62(2), 53–60.
- Damongilala, L. J. (2009). Kadar Air Dan Total Bakteri Pada Ikan Roa (*Hemirhampus* sp.) Asap Dengan Metode Pencucian Bahan Baku Berbeda. *Jurnal Ilmiah Sains*, 9, 198.
- Dewi, T. K., Agustiani, D., & Antonius, S. (2017). Secondary metabolites production by actinomycetes and their antifungal activity. *KNE Life Sciences*, 256-264.
- Ed-Har, A. A., Widyastuti, R., & Djajakirana, G. (2017). Isolasi dan Identifikasi Mikroba Tanah Pendegradasi Selulosa dan Pektin dari Rhizosfer *Aquilaria malaccensis*. *Buletin Tanah Dan Lahan*, 1(1), 58–64.
- Edwin. (2011). Materi Kuliah Mikrobiologi. Banjarbaru (ID): Universitas Lambung Mangkurat: Kalimantan Selatan
- Eziashi, E. I., Asemota, O., Okwuagwu, C. O., Eke, C. R., Chidi, N. I., & Oruade-Dimaro, E. A. (2014). Screening sterilizing agents and antibiotics for the elimination of bacterial contaminants from oil palm explants for plant tissue culture. *European Journal of Experimental Biology*, 4(4), 111–115. [www.pelagiaresearchlibrary.com](http://www.pelagiaresearchlibrary.com)
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S. B., Novšková, A., Chen, A. J., & Houbraken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in mycology*, 93(1), 1-63.
- Gandjar, I., & Rifai, M. A. (1999). *Pengenalan kapang tropik umum*. Yayasan Obor Indonesia.
- Kane, M. (2003). Bacterial and fungal indexing of tissue cultures. [https://www.hos.ufl.edu/moreweb/TissueCulture/class1/Bacterial\\_and\\_fungal\\_indexing\\_of\\_tissue\\_cultures.doc](https://www.hos.ufl.edu/moreweb/TissueCulture/class1/Bacterial_and_fungal_indexing_of_tissue_cultures.doc).
- Hasanah, U. (2017). Mengenal aspergillosis, infeksi jamur genus aspergillus. *Jurnal keluarga sehat sejahtera*, 15(2), 76-86.
- Kim, D. H., Gopal, J., & Sivanesan, I. (2017). Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC advances*, 7(58), 36492-36505.
- Lay, W. B. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada: Jakarta.
- Liang, C., Wu, R., Han, Y., Wan, T., & Cai, Y. (2019). Optimizing suitable antibiotics for bacterium control in micropagation of cherry rootstock using a modified leaf disk diffusion method and E test. *Plants*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/plants8030066>
- Marzuki, I., Noor, A., Nafie, N. La, & Djide, M. N. (2014). Isolasi dan identifikasi bakteri shimbion spons penghasil enzim amilase

- asal pantai melawai balikpapan. *Dr. Aloei Sabo e*, 1 (2), 11 – 18 . <https://doi.org/10.17605/OSF.IO/8WTRV>
- Mawarni, N. I. I., Erdiansyah, I., & Wardana, R. (2021). Isolasi cendawan Aspergillus sp. pada tanaman padi organik. *Agriprima: Journal of Applied Agricultural Sciences*, 5(1), 68-74.
- Nadha, H. K., Salwan, R., Kasana, R. C., Anand, M., & Sood, A. (2012). Identification and elimination of bacterial contamination during in vitro propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. *Pharmacognosy magazine*, 8(30), 93.
- Natassa, G., Supriadi, A., & Rukmi, M. I. (2013). Keanekaragaman dan Aktivitas Enzimatis Kapang Rizosfer Kacang Meongan (*Aeschynomene americana* L.) di Desa Sukolilo Barat, Kecamatan Labang, Kabupaten Bangkalan, Madura. *Jurnal Akademika Biologi*, 2(3), 8-16.
- Msogoya, T. J., Kanyagha, H., Mutigitu, J., Kulebelwa, M., & Mamiro, D. (2012). Identification and management of microbial contaminants of banana in vitro cultures. *Journal of Applied Biosciences* 55. 3987– 3994
- Noerfitryani, N & Hamzah, H. (2018). Inventarisasi Jenis – Jenis Cendawan Pada Rhizosfer Pertanaman Padi Inventory Types Of Fungi on Rice Plants Rhizosphere. *Jurnal Galung Tropika*, 7(1), 11–21.
- Ogunsanwo, Y. R. (2014). Sources of microbial contamination in tissue culture laboratories in southwestern Nigeria. April 2007.
- Omamor, I. B., Asemota, A. O., Eke, C. R., & Eziashi, E. I. (2007). Fungal contaminants of the oil palm tissue culture in Nigerian institute for oil palm research (NIFOR). *African Journal of Agricultural Research*, 2(10), 534–537. <https://doi.org/10.5897/AJAR.9000361>
- Oratmangun, K. M., Pandiangan, D & Kandou, F, E., (2017). Deskripsi Jenis-Jenis Kontaminan Dari Kultur Kalus *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Jurnal MIPA UNSRAT*, 6(1), 47-52
- Orlikowska, T., Nowak, K., & Reed, B. (2017). Bacteria in the plant tissue culture environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3), 487–508. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1144-9>
- Pelczar & Chan, 1989, *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid II*, diterjemahkan oleh Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutami, Sri Lestari, Universitas Indonesia: Jakarta, 545, 873
- Prakash, P. Y., & Bhargava, K. (2016). A modified micro chamber agar spot slide culture technique for microscopic examination of filamentous fungi. *Journal of microbiological methods*, 123, 126-129.
- Pratiwi, D. R., Wening, S., Nazri, E., & Yenni, Y. (2021). Penggunaan alkohol dan sodium hipoklorit sebagai sterilan tunggal untuk sterilisasi eksplan kelapa sawit. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit*, 29(1), 1-10.
- Putu, R. N. N., Srie, K. J. M., & Ayu, Ida Suryanti, P. (2018). Isolasi dan Identifikasi Jamur Mikroskopis Pada Rizofer Tanaman Jeruk Siam (*Citrus nobilis* Lour.) di Kecamatan Kintamani, Bali. *Jurnal Pendidikan Biologi Undiksha*, 6(1), 10–19.
- Rahayu, A S., & Gumilar, M. H.,M. (2017). Uji Cemaran Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung Dengan Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 4(2), 50. <https://doi.org/10.15416/ijpst.v4i2.13112>
- Ray, S. S., & Ali, N. (2017). Biotic Contamination and Possible Ways of Sterilization: A Review with Reference to Bamboo Micropropagation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 60(December), 1–12. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160485>
- Rismawati. (2018). Identifikasi Bakteri Endofit Daun Mangrove Api-Api Putih (*Avicennia Marina*) dan Potensinya Menghasilkan Senyawa Anti Mikroba. *Skripsi*, 108.
- Rosmania, R., & Yanti, F. (2020). Perhitungan jumlah bakteri di Laboratorium Mikrobiologi menggunakan pengembangan metode Spektrofotometri. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), 76-86.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsimbé S,

- Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. *Stud Mycol* 78 (1): 141-173. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004.
- Septiani, A. H. I., Kusmiyati, F., & Kristanto, B. A. (2022). Efektivitas ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* L.) sebagai anti kontaminan dalam pertumbuhan kultur jaringan kentang (*Solanum tuberosum* L.) Varietas Tedjo MZ. *Agroteknika*, 5(1), 60-74.
- Setiani, N. A., Nurwinda, F., & Astriany, D. (2018). Pengaruh desinfektan dan lama perendaman pada sterilisasi eksplan daun sukun (*Artocarpus altilis* (Parkinson ex. FA Zorn) Fosberg). *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 6(3).
- Setyati, W. A., Martani, E., & Zainuddin, M. (2015). Kinetika Pertumbuhan dan Aktivitas Protease Isolat 36k dari Sedimen Ekosistem Mangrove, Karimunjawa, Jepara. *Indonesian Journal of Marine Sciences/IImu Kelautan*, 20(3).
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in microbiology*, 7, 2087.
- Sulistijowati, R. (2012). Potensi filtrat *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4796 sebagai Biopreservatif pada Rebusan Daging Ikan Tongkol. *Indonesian Journal of Applied Sciences*, 2(2).
- Solyev, P. N., Isakova, E. B., & Olsufyeva, E. N. (2023). Antibacterial Conjugates of Kanamycin A with Vancomycin and Eremomycin: Biological Activity and a New MS-Fragmentation Pattern of Cbz-Protected Amines. *Antibiotics*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12050894>
- Tkacz J, S & Lange L. (1992). *Antibiotika dan Infeksi*. Jakarta: EGC.
- Todar, K. (2008). Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease. University of Wisconsin Madison Department of Bacteriology. <http://www.textbookofbacteriology.net/antimic> (Diakses pada 13 Desember 2023)
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus Penicillium. *Studies in mycology*, 78(1), 343-371.
- Wati, T., Astarini, I. A, Pharmawati, M, and Hendriyani, E. 2020. Propagation Of Begonia Bimaensis Undaharta & Ardaka Using Tissue Culture Technique. *Journal of Biological Sciences* 7(1): 112-122. DOI:10.24843/metamorfosa.2020.v07.i01.p1 5
- Wulandari, D. (2019). bioteknologi & biosains indonesia identifikasi dan karakterisasi bakteri amilolitik pada umbi colocasia esculenta l. secara morfologi, biokimia, dan molekuler Morphological, Biochemical, and Molecular Identification and Characterization of Amylolytic Bact. *Jurnal Biotehnologi Dan Biosains Indonesia*, 6 (2), 247 – 258 . <http://ejurnal.bppt.go.id/index.php/JBBI>.
- Zheng R,Y, Chen GQ, Huang H, & Liu X, Y. (2007). A monograph of *Rhizopus*. Sydowia 59: 273-372.

