

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI KAPANG KITINOLITIK TANAH DI
KAWASAN TAMAN HUTAN RAYA Prof. Ir. HERMAN JOHANNES
KABUPATEN KUPANG**

Kristina M. Nono, Maria T. L. Ruma, Djeffry Amalo, Rony S. Mauboy, Stefany Senda

Program Studi Biologi FST Undana

ABSTRAK

Kapang kitinolitik merupakan golongan kapang yang mampu menghasilkan enzim kitinase apabila ditumbuhkan dalam medium yang mengandung kitin. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kapang kitinolitik yang diisolasi dari rhizosfer di kawasan Taman Hutan Raya Prof Ir. Herman Johannes. Pengujian aktivitas kitinase dilakukan secara kualitatif berdasarkan indeks kitinolitik yang diperoleh dengan membagi diameter zona bening dengan diameter koloni. Isolat kapang kitinolitik selanjutnya dikarakterisasi morfologinya secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil penelitian memperoleh enam isolat kapang yang mempunyai aktivitas kitinase ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media agar kitin. Isolat TU6 mempunyai indeks kitinolitik tertinggi sebesar 2,45. Keenam isolat kapang kitinolitik memiliki karakter morfologi secara makroskopis dan mikroskopis yang bervariasi. Isolat TU6 diduga berasal dari genus *Penicillium*, isolat TB1 diduga berasal dari genus *Trichoderma*, isolat TH1, TH3 dan TT1 diduga berasal dari genus *Aspergillus*, dan isolat TT4 diduga berasal dari genus *Rhizopus*.

Kata kunci: kapang, rhizosfer, kitinase, morfologi, TAHURA

Kitin merupakan suatu polisakarida yang tersusun oleh monomernya β -1,4-N-asetil-glukosamin. Kelimpahan kitin di alam menempati urutan terbesar kedua setelah selulosa dan terdistribusi luas di lingkungan biosfer (Herdyastuti *dkk*, 2009). Pengolahan limbah mengandung kitin dapat dilakukan dengan melibatkan enzim kitinase. Proses enzimatik melibatkan kitinase relatif lebih baik karena terurai secara biologis (*biodegradable*), ramah lingkungan (*biocompatible*) dan lebih ekonomis (Gohel *dkk*, 2008).

Mikroorganisme menjadi salah satu sumber potensial untuk menghasilkan kitinase. Produksi enzim kitinase dari mikroorganisme lebih baik karena kemudahannya berkembangbiak dalam waktu yang relatif singkat (Pratiwi *dkk*, 2015), lebih mudah dikultur, waktu produksi relatif lebih cepat dan biaya produksi lebih ekonomis (Anbu *dkk*, 2013). Mikroorganisme yang dapat dikultur untuk menghasilkan enzim kitinase salah satunya adalah kapang. Kapang kitinolitik adalah golongan kapang yang mampu menghasilkan enzim kitinase (Khikmah *dkk*, 2016). yang dapat diperoleh dari lingkungan yang mengandung kitin salah satunya adalah tanah (Thakur *dkk*, 2019; Khikmah *dkk*, 2016).

Taman hutan raya Prof Ir. Herman Johannes merupakan satu-satunya taman hutan raya yang terdapat di Provinsi Nusa Tenggara Timur, tepatnya di Desa Kotabes, Kecamatan Amarasi, Kabupaten Kupang. Kawasan dengan luas ± 2000 ha memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi, termasuk keanekaragaman mikroorganisme tanah.

Senyawa organik yang terkandung dalam tanah seperti kitin dengan mudah terdegradasi oleh kehadiran kapang yang mampu menghasilkan enzim kitinase. Sehingga diharapkan Taman Hutan Raya Prof. Ir Herman Johannes menjadi kawasan potensial untuk isolasi kapang kitinolitik.

MATERI DAN METODE

Pembuatan Koloidal Kitin

Dimasukan 5 gram serbuk kitin ke dalam erlenmeyer yang berisi 100 ml HCL pekat kemudian ditutup rapat dan distirer selama 2 jam. Larutan kemudian didiamkan dalam lemari pendingin pada suhu 4°C selama 24 jam. Larutan disaring menggunakan kertas saring ke dalam aquades steril sehingga filtrat tercampur ke dalam aquades kemudian pH larutan diatur menjadi 7 dengan penambahan NaOH. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 10 menit dan diperoleh endapan. Endapan kemudian dibersihkan dengan aquades steril dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Disimpan endapan berupa koloidal kitin pada suhu dingin dan siap digunakan untuk pembuatan media agar kitin (Widhyastuti, 2007).

Pembuatan Media Agar Kitin

Ditimbang 0,7 g K_2HPO_4 , 0,3 g KH_2PO_4 , 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001 g $ZnSO_4$, 0,001 g $MnCl_2$, 2 g koloidal kitin, dan 20 g agar dimasukan ke dalam 1000 ml aquades kemudian dilarutkan menggunakan *hot plate* sehingga diperoleh medium. Medium kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Setelah suhunya menurun ($\pm 45^{\circ}\text{C}$), medium dituangkan ke dalam cawan petri dan didiamkan selama 15 menit. (Khikmah *dkk*, 2016).

Penentuan Sampel dan Pengambilan Sampel Tanah

Ditentukan secara acak lima pohon berukuran besar (diameter batang >50 cm) yang berada di bagian barat, timur, utara, dan selatan serta bagian tengah taman hutan raya sebagai titik sampling. Setiap titik sampling ditentukan 4 sub contoh sesuai arah mata angin. Sub contoh pada setiap pohon yaitu tanah yang berada sejajar atau tegak lurus dengan mahkota daun terluar (wilayah akar serabut) dari empat penjuruan mata angin. Pengambilan sampel tanah rhizosfer dilakukan terlebih dahulu dengan membuat plot ukuran 25×25 cm pada setiap sub contoh dan tanah diambil pada diameter galian ± 12 cm dengan kedalaman 0-25 cm. Terdapat 4 sub contoh untuk setiap tanaman sehingga diperoleh 20 sub contoh yang masing-masing dikompositkan dan didapatkan 5 sampel tanah.

Isolasi dan Pemurnian Kapang

Ditimbang masing-masing 10 gram sampel tanah disuspensikan dalam 100 ml aquades steril lalu dihomogenkan selama 20 menit. Dipindahkan 1 ml suspensi ke dalam 9 ml aquades steril dan dihomogenkan sehingga diperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengenceran berseri dilakukan hingga pada tingkat pengenceran 10^{-5} . Dipipet 1 ml pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} masing-masing dimasukkan ke dalam cawan yang telah berisi media PDA yang telah ditambahkan kloramfenikol. Suspensi disebarkan secara merata ke seluruh permukaan media.

Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada suhu 25°C selama tujuh hari (Purwanti, 2009). Koloni kapang yang tumbuh selama proses isolasi dimurnikan ke media PDA baru kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama tujuh hari. Pemurniaan kapang dilakukan sebanyak dua kali.

Uji aktifitas kitinase

Diambil kultur isolat kapang hasil pemurnian kemudian ditanamkan pada media agar kitin yang telah memadat diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 30°C . Zona bening yang terbentuk mengindikasikan isolat tersebut adalah kapang kitinolitik (Thakur *dkk*, 2019). Zona bening kemudian divisualisasikan mengikuti metode Suryadi *dkk* (2013) yaitu menambahkan beberapa tetes *congo red* 0,1% pada cawan berisi media agar kitin. Cawan selanjutnya dicuci dengan aquades untuk melunturkan *congo red*. Dihitung indeks kitinolitik dengan membagi diameter zona jernih di sekeliling koloni dengan diameter koloni.

$$\text{Indeks kitinolitik} = \frac{\text{diameter zona bening (mm)}}{\text{diameter koloni (mm)}}$$

Pengamatan Karakter Morfologi Isolat Kapang Kitinolitik

Pengamatan dilakukan pada kultur kapang yang ditumbuhkan kembali pada media PDA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama tujuh hari. Pengamatan struktur makroskopis kapang meliputi warna koloni, warna sebalik koloni (*reverse side*), tekstur permukaankoloni, garis-garis radial (*radial forrow*), lingkaran-lingkaran konsentris dan zona pertumbuhan (*growing zone*). Sedangkan pengamatan karakter morfologi kapang kitinolitik secara mikroskopis dengan membuat *slide cultur* dan preparat meliputi bentuk konidia/

sporangiospora, bentuk vesikel, bentuk fialid, konidiofor tunggal/berkelompok, konidiofor bercabang/tidak bercabang, hifa bersekat/tidak bersekat. Data hasil karakterisasi kapang secara makroskopis dan mikroskopis yang diperoleh dibandingkan dengan buku acuan Fungi and Food Spoilage (Pitt dan Hocking, 1997) dan Pengenalan Kapang Tropik Umum (Gandjar *dkk*, 1999).

Analisis Data

Data hasil pengamatan ditampilkan dalam bentuk gambar maupun tabel yang selanjutnya dianalisis secara deksriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Pemurnian Kapang

Hasil isolasi jamur pada setiap kode pengambilan memperlihatkan jamur yang tumbuh memiliki jumlah koloni dan karakter morfologi yang beragam. Hal ini dikarenakan tanah rhizosfer yang digunakan sebagai sampel diambil dari tumbuhan yang berbeda-beda lokasinya.

Setiap tumbuhan akan beradaptasi dengan lingkungan tempat tumbuhnya dan menciptakan komunitas mikroba rhizosfernya masing-masing. Zhuang *dkk* (2013) menyatakan bahwa interaksi tumbuhan dengan mikroba di rhizosfer dimediasi oleh eksudat akar.

Selanjutnya Broeckling *dkk* (2008) menyatakan bahwa eksudat akar dapat berfungsi sebagai agen selektif sehingga tanaman dapat mengatur komunitas jamur di lingkungan rhizosfernya. Selanjutnya dilakukan proses pemurnian untuk memisahkan masing-masing koloni berdasarkan perbedaan karakteristik secara makroskopis. Hasil pemurnian didapatkan 20 isolat kapang.

Aktivitas Kitinase Kapang Kitinolitik

Dua puluh isolat kapang melewati pengujian aktivitis kitinase dan diperoleh enam isolat kapang kitinolitik yang dapat dilihat pada tabel 1.

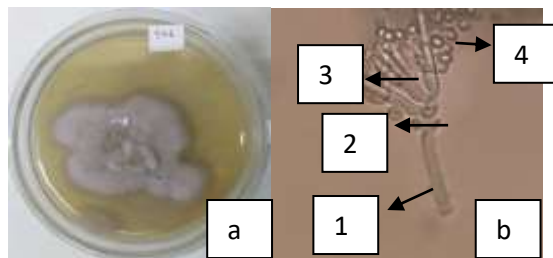
Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Kitinase

Kode isolat	Diameter		Indeks kitinolitik
	Zona bening (mm)	Koloni (mm)	
TU6	27	11	2,45
TB1	21	9	2,33
TH1	16	7	2,28
TH3	22	16	1,37
TT1	18	14	1,28
TT4	28	27	1,03

Berdasarkan data pada tabel 1 Isolat TU6 memiliki nilai indeks kitinolitik terbesar yakni 2,45. Nilai indeks kitinolitik terkecil yakni 1,03 dihasilkan oleh isolat TT4. Indeks kitinolitik menunjukkan kemampuan degradasi kapang terhadap substrat kitin. Isolat TU6 diduga mampu memanfaatkan kitin sebagai sumber karbon dengan melepaskan lebih banyak enzim kitinase untuk mendegradasi substrat kitin pada media menjadi monomer N-asetilglukosamin. Sebaliknya rendahnya kemampuan isolat TT4 dalam memanfaatkan kitin pada media menyebabkan rendahnya enzim kitinase yang disekresikan kapang untuk memecah substrat kitin menjadi monomer N-asetilglukosamin.

Karakteristik Morfologi Kapang Kitinolitik

Karakteristik keenam isolat kapang kitinolitik adalah sebagai berikut,



Gambar 1. Isolat TU6, (a) Koloni kapang pada media PDA berumur tujuh hari, (b) Pengamatan mikroskop pada perbesaran 1000 kali tanpa pewarnaan. (Keterangan: 1. Konidiofor, 2. Metula, 3. Fialid, 4. Konidia)

2. Isolat TB1

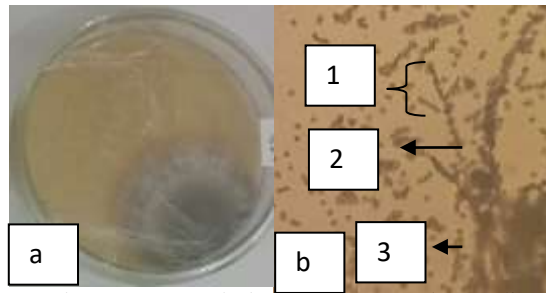
Isolat TB1 memiliki karakteristik makroskopis koloni bagian tengah berwarna hijau abu-abu berbentuk lingkaran dengan batas yang jelas sedangkan bagian pinggir koloni berwarna putih, sebalik koloni berwarna putih kehijauan, permukaan dan tepi koloni rata, tekstur permukaan seperti

1. Isolat TU6

Isolat TU6 memiliki karakteristik makroskopis koloni berwarna merah muda, sebalik koloni berwarna kuning, permukaan koloni rata, tepi koloni tidak beraturan, tekstur permukaan koloni seperti beludru yang ditandai dengan hifa aerial yang pendek, memiliki garis-garis radial (*radial furrow*) yang diamati dari sebalik koloni, tidak memiliki lingkaran-lingkaran konsentris dan zona pertumbuhan (*growing zone*). Secara mikroskopis secara mikroskopis isolat TU6 memiliki konidia berbentuk, fialid berbentuk seperti botol yang meruncing pada bagian ujung dan membawa konidia, 2-3 fialid melekat pada sebuah metula, tangkai konidiofor memiliki tipe percabangan *biverticillate* dan memiliki hifa yang bersekat. Isolat TU6 dapat dilihat pada gambar 1.

kapas, memiliki garis-garis radial (*radial furrow*), memiliki lingkaran-lingkaran konsentris dengan batas yang jelas, memiliki zona pertumbuhan (*growing zone*). Berdasarkan pengamatan karakter morfologi secara mikroskopis, isolat TB1 memiliki konidiofor yang bercabang-cabang, fialid berada pada ujung konidiofor berjumlah 2-3

berbentuk seperti daun yang meruncing pada ujungnya, konidia berada di ujung fialid berbentuk semi bulat sampai bulat, dan memiliki hifa yang bersekat.

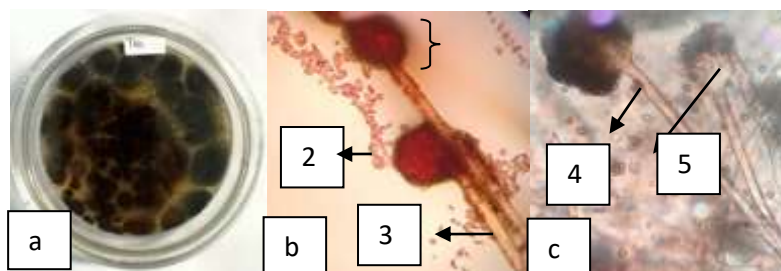


Gambar 2. Isolat TB1, (a) koloni kapang pada media PDA berumur tujuh hari, (b) Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 400 kali tanpa pewarnaan. (Keterangan 1. Fialid 2. Konidiofor, 3. Konidia)

3. Isolat TH1

Isolat TH1 memiliki karakter makroskopis yaitu koloni berwarna hitam dan telah bersporulasi, sebalik koloni berwarna putih pucat, permukaan koloni dan tepi koloni rata, tekstur permukaan kasar berbutir dan seperti tepung dapat terlihat dari lapisan konidiofor yang kasar dan berbutir lebat berwarna hitam, memiliki garis-garis radial (*radial furrow*), tidak memiliki lingkaran-lingkaran konsentris dan zona pertumbuhan (*growing zone*).

Berdasarkan hasil pengamatan karakter morfologi secara mikroskopis isolat TH1 tidak ditemukan struktur reproduksi seksual yang menunjukkan kapang TH1 berada pada fase anamorf. Isolat TH1 memiliki konidia tunggal berbentuk bulat berwarna hitam, fialid merupakan struktur yang mendukung konidia, struktur konidiofor tunggal dan tidak bercabang, ujung konidiofor membentuk vesikel yang tampak membulat serta memiliki struktur hifa yang bersekat. Isolat TH1 dapat dilihat pada gambar 3

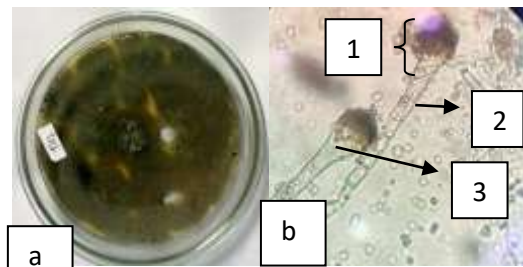


Gambar 3. Isolat TH1 (a) Koloni kapang pada media PDA berumur tujuh hari, (b) Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 400 kali tanpa pewarnaan, (c) Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 1000 kali tanpa pewarnaan. (Keterangan: 1. Kepala konidia; 2. Konidia; 3. Konidiofor; 4. Vesikel; 5. Fialid)

4. Isolat TH3

Isolat TH3 memiliki karakter makroskopis yaitu koloni berwarna hijau, dimana pada awal inkubasi isolat TH3 memiliki warna hijau terang namun seiring bertambahnya waktu inkubasi koloni terlihat memiliki warna hijau yang lebih gelap, sebalik koloni berwarna kuning, tepi koloni tidak beraturan, permukaan koloni rata, tekstur permukaan berciri *powdery* atau seperti tepung halus yang disebabkan pembentukan konidia yang lebat, terdapat garis-garis radial (*radial forrow*) yang diamati dari sebalik

koloni, tidak terdapat lingkaran-lingkaran konsentris dan zona pertumbuhan (*growing zone*). Berdasarkan pengamatan karakteristik secara mikroskopis, Isolat TH3 memiliki konidia berbentuk bulat ditopang oleh fialid, vesikel merupakan struktur dari konidiofor yang membengkak berbentuk lonjong, memiliki konidiofor tunggal bersekat, dan memiliki struktur hifa yang bersekat. Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopis dan mikroskopis isolat TH3 dapat dilihat pada gambar 4.

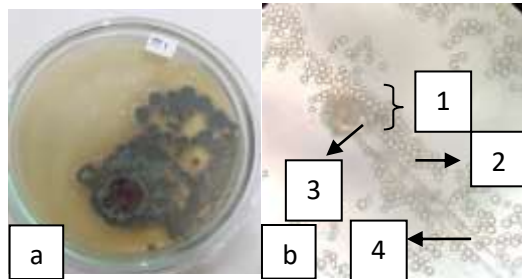


Gambar 4. Isolat TH3, (a) Koloni kapang pada media PDA berumur tujuh hari, (b) Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 400 kali tanpa pewarnaan, (c) Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 1000 kali tanpa pewarnaan. (Keterangan: 1. Kepala konidia, 2. Konidiofor, 3. Vesikel)

5. Isolat TT1

Pengamatan karakter morfologi isolat TT1 secara makroskopis pada medium PDA berumur tujuh hari yang diinkubasi pada suhu 30°C menunjukkan bahwa isolat TT1 memiliki karakteristik koloni berwarna hijau sebalik koloni berwarna merah, tepi dan permukaan koloni rata, tekstur permukaan menyerupai beludru, garis-garis radial (*radial forrow*) terlihat pada sebalik koloni, terdapat zona pertumbuhan (*growing zone*) dan tidak ditemukan lingkaran-lingkaran konsentris.

Karakter morfologi secara mikroskopis pada isolat TT1 berada pada fase anamorf yaitu ditemukan struktur spora aseksual yang disebut konidiospora. Struktur spora aseksual yang teramati meliputi konidia, fialid, vesikel dan konidiofor. Konidia berbentuk bulat, ujung konidiofor membengkak menjadi vesikel yang tampak semi bulat, memiliki struktur konidiofor tunggal serta tidak bercabang dan memiliki struktur hifa bersekat. Hasil pengamatan karakter morfologi secara makroskopis dan mikroskopis isolat TT1 dapat dilihat pada gambar 5

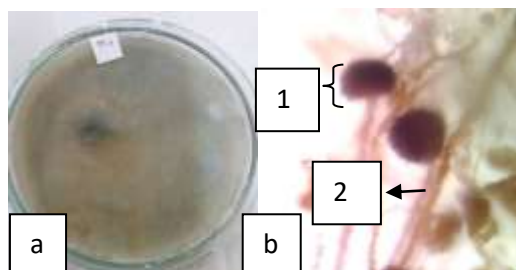


Gambar 5. Isolat TT1, (a) Koloni kapang pada media PDA berumur tujuh hari, (b) Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 1000 kali tanpa pewarnaan, (Keterangan: 1. Kepala konidia, 2. Konidia, 3. Vesikel, 4. Konidiofor) (Dok. Senda, 2021)

6. Isolat TT4

Isolat TT4 memiliki karakteristik koloni berwarna putih pada awal inkubasi menjadi abu-abu kehijauan sedikit kehitaman seiring bertambahnya waktu usia biakan, sebalik koloni berwarna kuning, tekstur permukaan berciri *wooly* atau berambut, tepi koloni tidak dapat ditentukan karena pertumbuhan isolat TT4 sangat cepat dibuktikan dengan miselium yang memenuhi seluruh cawan dalam waktu kurang dari tujuh hari, tidak terlihat

memiliki garis-garis radial (*radial furrow*) pada sebalik koloni, tidak memiliki lingkaran-lingkaran konsentris dan zona pertumbuhan (*growing zone*). Isolat TT4 secara mikroskopis menghasilkan spora aseksual yang teramati disebut sporangiospora. Sporangiospora berada di dalam sporangium yang berbentuk semi bulat, sporangiofor tidak bercabang merupakan hifa yang mendukung sporangium, memiliki rhizoid dan memiliki hifa yang tidak bersekat. isolat TT4 dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Isolat TT4, (a) Koloni kapang pada media PDA berumur tujuh hari, (b) Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 400 kali tanpa pewarnaan. (Keterangan 1. Sporangium, 2. Sporangiofor)

PENUTUP

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa tanah rhizosfer di kawasan Taman Hutan Raya Prof Ir. Herman Johannes mengandung kapang kitinolitik dimana aktivitas kitinase berdasarkan nilai indeks kitinolitik berkisar antara 1,03-2,45. Karakteristik morfologi isolat kapang kitinolitik TU6, TB1, TH1, TH3, TT1 dan TT4 secara makroskopis dan mikroskopis bervariasi. Isolat TU6 diduga berasal dari genus *Penicillium*, isolat TB1 diduga berasal dari genus *Trichoderma*, isolat TH1, TH3, TT1 diduga berasal dari genus *Aspergillus*, dan isolat TT4 diduga berasal dari genus *Rhizopus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anbu, P., S.C.B Gopinath., A.C. Cihan dan B.P. Chaulagain. (2013). Microbial Enzymes and Their Application in Industries and Medicine. *BioMed Research Internasional*: 1-2.
- Broeckling, C.D., A.K. Broz., J. Bergelson., D.K. Manter dan J.M. Vivanco. (2008). Root Exudates Regulate Soil Fungal Community Composition and Diversity. *Environmental Microbiology*: 74(3): 738-744.
- Dahiya, N., R. Tewari dan G.S. Hoondal. (2006). Biotechnological Aspect of Chitinolytic Enzymes: a Review. *Appl Microbiol Biotechnol*: 71: 773-782.
- Gandjar, I., R.A Samson., K.V.D Tweel-Vermeulen., A. Oetari dan I. Santoso. (1999). *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Gohel, V., V.M. Singh., P. Ashwani dan H.S. Chattpar. (2006). Bioprospecting and Antifungal Potential of Chitinolytic Microorganism. *African Journal of Biotechnology*: 5(2): 54-72.
- Herdyastuti, N., T.J. Raharjo., Mudasir dan S. Matsjeh. (2009). Chitinase and Chitinolytic Microorganism: Isolation, Characterization and Potential. *Indonesian Journal of Chemistry*: 9(1): 37-47.
- Khikmah, N., S. Margino dan S.R. Kasiamdari. (2016). Isolasi, Seleksi, dan Identifikasi Kapang Kitinolitik yang Diisolasi dari Tanah Pembuangan Limbah Udang dan Rizosfer Solanacea. *Biota*: 1(1): 1-8.
- Suryadi, Y., T.P. Priyatno., D.N. Susilowati., N. Lawati dan E. Kustaman. (2013). Pemurnian Parsial dan Karakterisasi Kitinase Asal Jamur Entomopatogen *Beauverria bassiana* Isolat BB200109. *Jurnal AgroBiogen*: 9(2): 77-84.
- Thakur, N., R. Gupta., A.K. Nath., A. Chauhan., M. Thakur dan H. Panday. (2019). Isolation, Screening And Characterisation of Chitinase Producing Jamur from Apple Orchards of Shimla And Kinnaur Distric, India. *Internasional Journal Of Current Microbiology and Applied Sciences*: 8(1): 1556-1563.

- Patil, S.R., V. Ghormade dan Deshpande. (1999). Chylinolytic Enzymes: An Eksplorasi. *Enzyme and Microbial Technology*: 26(2000): 473-483.
- Pitt, J.I dan A.D. Hocking. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Profesional. London.
- Pratiwi, R.S., T.E. Susanto., Y.A.K. Wardhani dan A. Sutrisno. (2015). Enzim Kitinase dan Aplikasi di Bidang Industri. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*: 3(3): 878-887.
- Purwanti, S., R.B. Hastuti. (2009). Isolasi dan Identifikasi Jamur Indegenous Rhizosfer Tanaman Kentang dari Lahan Pertanian Kentang Organik di Desa Pakis, Magelang. *Bioma*: 11(2): 45-53.
- Widhyastuti, Nunuk. (2007). Produksi Kitinase Ekstraseluler *Aspergillus rugulosus* 501 Secara Optimal pada Media Cair. *Berita Biologi*: 8(6): 547-553.
- Zhuang, X., J. Gao, M. Ma, S. Fu dan G. Zhuang. (2013). Review Bioactive Molecules in Soil Ecosystems: Masters of the Underground. *Internasional Journal of Molecular Sciences*. 14(5): 8841-8868.