

OPTIMASI VOLUME BUFFER EKSTRAKSI DALAM MENGISOLASI DNA SPESIES MIKORIZA ARBUSKULAR UNTUK IDENTIFIKASI SECARA MOLEKULER

OPTIMIZATION OF EXTRACTION BUFFER VOLUME IN ISOLATING ARBUSCULAR MYCORRHIZAL DNA FOR MOLECULAR IDENTIFICATION

Fitri Yelli*, Maria Viva Rini dan Inggar Damayanti
Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Lampung; Indonesia
*Email: fitri.yelli@fp.unila.ac.id

* Corresponding Author, Diterima: 2 Mar. 2022, Direvisi: 26 Mei 2022, Disetujui: 3 Jun. 2022

ABSTRACT

Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) has the ability to increase plant growth by helping the absorption of water and nutrients from the soil. In addition, AMF also plays a role in increasing plant resistance to pathogenic attacks. Laboratory of Plantation Production, Faculty of Agri culture, Lampung University has 35 collections of mycorrhizal isolates. These isolates have not been well identified in the species level. This study aims at testing four volumes of InstaGene Matrix™ extraction buffer which are effective and economical for AMF DNA isolation to be used for molecular identification. DNA isolation of 4 AMF isolates, namely Glomus sp., Gigaspora sp., Acaulospora sp., and Entrophospora sp. is conducted by using Instagene™ Matrix (BIO-RAD) extraction buffer with the volume of 10, 15, 20, and 25 µl. To see the success of DNA Isolation is by use the isolated DNA directly as a template in PCR process. The research results show that all of the volumes (10, 15, 20, and 25µl) of extraction buffer were able to extract DNA from all of the four isolates tested except the concentration of 20 µl for the isolate of Gigaspora sp.. Therefore, a volume of 10 µl of extraction buffer is able and more efficient to be used to extract AMF DNA spores.

Keywords: DNA, identification, isolation, mycorrhizae, nested PCR.

ABSTRAK

Fungi Mikoriza Arbuskular (FMA) mampu meningkatkan pertumbuhan tanaman dengan cara membantu penyerapan air dan unsur hara dari dalam tanah. Selain itu, FMA juga berperan dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap serangan patogen. Laboratorium Produksi Tanaman Perkebunan Fakultas Pertanian Universitas Lampung memiliki 35 koleksi isolat mikoriza. Isolat-isolat koleksi tersebut belum teridentifikasi dengan baik sampai ke level spesies. Penelitian ini bertujuan untuk menguji empat volume buffer ekstraksi InstaGene™ Matrix yang efektif dan ekonomis untuk isolasi DNA FMA yang akan digunakan untuk identifikasi secara molekuler. Isolasi DNA 4 isolat FMA yaitu Glomus sp., Gigaspora sp., Acaulospora sp., dan Entrophospora sp. dilakukan dengan menggunakan buffer ekstraksi Instagene Matrix (BIO-RAD) dengan volume 10, 15, 20, dan 25 µl. Untuk melihat keberhasilan isolasi DNA yang dilakukan yaitu dengan menggunakan DNA tersebut sebagai template atau cetakan dalam proses PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua volume (10, 15, 20, dan 25 µl) buffer ekstraksi yang diujikan mampu mengekstrak DNA dari ke 4 isolat yang diuji kecuali volume 20 µl pada isolat Gigaspora sp. Oleh karena itu, volume 10 µl buffer ekstraksi sudah dapat digunakan dan lebih efisien untuk mengekstrak DNA dari spora FMA.

Kata kunci: DNA, identifikasi, isolasi, mikoriza, nested PCR.

1. PENDAHULUAN

Fungi mikoriza merupakan jamur yang ber simbiosis mutualisme dengan hampir 80% tanaman yang ada di alam dan 67% diantaranya adalah fungi mikoriza arbuskular (FMA) (Begum *et al.*, 2019). Hubungan simbiotik yang dibangun antara tanaman khususnya akar dengan jamur mikoriza adalah berupa peningkatan penyerapan air dan unsur hara (khususnya fosfor), peningkatan ketahanan terhadap stress dan perlindungan terhadap serangan patogen (Song *et al.*, 2015). Aplikasi mikoriza pada bibit kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) yang berada dalam kondisi cekaman air menunjukkan indikator-indikator pertumbuhan yang lebih baik dibanding dengan bibit yang tidak diberikan perlakuan mikoriza (Rini & Efriyani, 2016). Beragam manfaat dari jamur mikoriza telah diketahui, namun pemanfaatannya masih terbatas.

Identifikasi fungi mikoriza meliputi jenis serta peranannya terhadap tanaman penting dilakukan agar potensinya dapat dimaksimalkan. Sejauh ini identifikasi mikoriza dilakukan secara tradisional / konvensional melalui pengamatan mikroskopik pada spora mikoriza yang diisolasi dari tanah (Deswiniyanti *et al.*, 2017). Kelemahan identifikasi mikoriza konvensional yaitu tidak bisa konsisten dilakukan untuk semua jenis mikoriza dan di semua daerah penghasil mikoriza. Identifikasi atau karakterisasi morfologi sangat tergantung kepada produksi spora dari masing-masing mikoriza, sedangkan tidak semua jenis mikoriza mampu menghasilkan spora dalam jumlah banyak dan bahkan produksi spora juga dipengaruhi oleh musim tertentu (Schultz, 2019). Identifikasi morfologi menggunakan spora yang dikoleksi dari lapangan cenderung lebih riskan terhadap rusaknya spora selama proses pengisolasiannya (Redecker & Wiemken, 2003), disamping itu prosesnya juga relatif sulit karena terjadinya perubahan penampilan morfologi selama masa perkembangan spora tersebut (Nobuhito *et al.*, 2011).

Kemajuan terbaru dalam bidang biologi molekuler dapat membantu mengatasi keterbatasan identifikasi dengan karakter morfologi serta berpotensi untuk membantu mempercepat identifikasi jenis. Identifikasi secara molekuler merupakan salah satu pendekatan yang telah digunakan oleh beberapa peneliti untuk mengidentifikasi mikoriza arbuskular (Crossay *et al.*, 2017; Na *et al.*, 2019).

Parameter untuk menetapkan identitas dari fungi mikoriza arbuskular menggunakan metode

molekuler ini adalah dengan cara melihat kesamaan (polimorfisme) yang terdapat pada sekuens tiap gen-nya dengan melakukan sekuensing terhadap produk Polymerase Chain Reaction (PCR) (Sha *et al.*, 2016). Keberhasilan terbentuknya produk PCR tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pemilihan metode ekstraksi DNA yang tepat.

Diédhiou *et al.*, (2014) telah berhasil melakukan isolasi DNA fungi mikoriza dengan menggunakan beberapa reagen kimia seperti, DNeasy Plant Mini Kit, serta menggunakan 3 buffer ekstraksi yaitu PVP (polyvinylpyrrolidone), PVPP (polyvinylpoly-pyrrolidone) dan AC (activated charcoal) yang diaplikasikan secara sendiri atau dikombinasikan. Sedangkan (Saito, 2015) menggunakan buffer ekstraksi dari Bio-Rad yaitu InstaGene Matrix.

InstaGene matrix (Bio-Rad) merupakan salah satu larutan yang berfungsi untuk mempercepat proses isolasi DNA mikoriza, selain itu DNA yang dihasilkan mempunyai kualitas yang bagus yang cocok untuk digunakan sebagai *template* untuk PCR. Untuk melakukan isolasi DNA mikoriza volume InstaGene Matrix yang digunakan adalah 20 µl untuk semua jenis spora (Taylor *et al.*, 2014), Sedangkan ukuran spora mikoriza bervariasi dari yang ukuran kecil yaitu 20 µm untuk spesies *Glomus* sampai 480 µm untuk spesies *Gigaspora*. Oleh karena itu, diperlukan optimasi volume larutan InstaGene yang sesuai dengan ukuran spora mikoriza. Untuk ukuran spora yang kecil diharapkan volume larutan yang digunakan bisa diturunkan tetapi tidak menurunkan konsentrasi dan kualitas DNA yang dihasilkan sehingga akan lebih menguntungkan dan lebih ekonomis. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menetapkan volume buffer ekstraksi untuk proses isolasi DNA mikoriza sebagai langkah awal identifikasi spesies.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Produksi Perkebunan dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret 2020 sampai dengan September 2020.

2.2 Bahan dan Alat

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 spesies Fungi Mikoriza Arbuskular (FMA) yang merupakan bagian dari koleksi isolat yang

sudah diidentifikasi secara morfologi yang ada di Laboratorium Produksi Perkebunan Universitas Lampung. Spesies FMA tersebut memiliki diameter spora yang berbeda-beda, antara lain: (1) *Glomus* sp. isolat MV4 (226,7 μm); (2) *Entrophospora* sp. isolat MV2 (113,33 μm); (3) *Gigaspora* sp. isolat MV8 (371,67 μm) dan (4) *Acaulospora* sp. isolat MV33 (193,33 μm)

Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi DNA mikoriza adalah spora tunggal dari masing-masing isolat, kit komersial InstaGene™ Matrix (Bio-Rad) untuk isolasi DNA, mikropipet dan tips, gloves, Ethidium bromide (EtBr), agarose gel, larutan buffer (TBE 1x, TE 1x), sonikator, *waterbath*, mesin PCR. Bahan yang digunakan untuk PCR adalah PCR kit MyTaq™ Red Mix (Bioline, USA), pasangan primer NS1 dan NS4 dan pasangan primer AML1 dan AML2, serta ddH₂O.

2.3 Persiapan Spora Tunggal Mikoriza

Spora mikoriza yang akan diidentifikasi diisolasi menggunakan metode penyaringan basah menggunakan saringan mikro ukuran 35 μm , 150 μm , 350 μm , dan 500 μm dengan bantuan pinset spora. Spora hasil isolasi dimasukkan ke dalam gelas arloji. Selanjutnya dipilih 10-20 spora untuk dibersihkan menggunakan air steril. Spora tersebut dimasukkan ke dalam microtube 1 ml dan ditambahkan air sebanyak 0,25 ml. Kemudian spora dimasukkan ke dalam sonikator dan disonikasi selama 10 detik untuk membersihkan partikel-partikel yang melekat di dinding spora. Hal yang sama diulang sebanyak 3 kali untuk meyakinkan spora benar-benar bersih. Spora yang sudah bersih ini siap untuk digunakan dalam proses isolasi DNA.

2.4 Isolasi DNA Mikoriza

Isolasi DNA dilakukan pada spora tunggal mikoriza. Hal ini dilakukan untuk menghindari tercampurnya spora dari jenis mikoriza yang lainnya. Metode ekstraksi DNA yang akan dilakukan yaitu dengan mengisolasi 1 spora FMA ke dalam cawan atau microtube steril yang berisi Tween-20 dengan konsentrasi 0,05% di bawah mikroskop stereo. Selanjutnya spora yang berada di dalam microtube steril dimasukkan ke dalam Ultrasonic Cleaner selama 1 menit yang bertujuan untuk membersihkan spora tersebut dari kontaminan-kontaminan. Spora dipindahkan ke dalam microtube 0,2 ml steril menggunakan pinset spora. Spora disimpan dalam suhu -40°C selama semalam. Setelah itu

ditambahkan InstaGene Matrix (BIO-RAD) ke dalam microtube yang berisi spora tersebut dengan 4 volume berbeda yaitu: 10 μL , 15 μL , 20 μL , dan 25 μL , masing-masing volume diulang sebanyak dua kali.

Spora digerus menggunakan pipet tip steril dengan ujung tumpul sampai hancur. Kemudian dipanaskan pada suhu 56°C selama 30 menit dan 95°C selama 10 menit menggunakan Thermal Cycler. Dilakukan proses *spin down* dan diambil supernatannya sebanyak 5 - 25 μL lalu dipindahkan ke microtube 0,2 ml steril, selanjutnya digunakan sebagai DNA *template*, atau jika tidak langsung digunakan dapat disimpan pada suhu -40°C.

2.5 PCR DNA Spora Mikoriza

DNA hasil ekstraksi selanjutnya diamplifikasi dengan pasangan primer NS1 sebagai Forward dan NS4 sebagai primer Reverse pada mesin PCR (Tabel 1). Primer ini mengamplifikasi bagian ribosom subunit besar pada eukariot. Reagen-reagen yang diperlukan untuk PCR dibuat berupa master mix PCR yang bertujuan untuk menghomogenkan semua reagen yang digunakan pada setiap sampel. Komposisi bahan yang digunakan dalam PCR mix adalah sebagai berikut: MyTaq™ Mix (Bioline) sebanyak 12,5 μL , 1,25 μL (10 μM) primer forward (NS1), 1,25 μL (10 μM) primer reverse (NS1), ddH₂O steril sebanyak 9 μL dan DNA template sebanyak 1 μL sehingga total volume reaksi adalah 25 μL . Semua bahan dimasukkan ke dalam microtube steril 0,2 ml, kemudian di *spin down* dan dimasukkan ke dalam Thermal Cycler dengan kondisi PCR seperti pada Tabel 2. Selanjutnya dilakukan *nested* PCR yaitu produk PCR awal digunakan kembali sebagai cetakan DNA untuk PCR kedua dengan primer AML1 dan AML2 (Tabel 1).

PCR mix untuk reaksi dengan AML1 dan AML2 ini adalah sebagai berikut: MyTaq™ Mix (Bioline) sebanyak 12,5 μL , 1,25 μL (10 μM) primer forward (AML1), 1,25 μL (10 μM) primer reverse (AML2), ddH₂O steril sebanyak 9 μL dan DNA *template* sebanyak 1 μL sehingga total volume reaksi adalah 25 μL dengan kondisi PCR seperti pada Tabel 3. Hasil amplifikasi dikonfirmasi pada elektroforesis gel agarose 0,2% (TBE 1x).

2.6 Visualisasi PCR produk (Elektroforesis)

Proses elektroforesis diawali dengan menyiapkan larutan agarose gel 0,5%. Setelah dipanaskan hingga mendidih dan semua agarose

Tabel 1. Urutan Sekuen Basa Primer NS1, NS4, AML1 dan AML2

Primer	Sekuen basa	Jumlah basa
NS1	(5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3')	19 basa
NS4	(5'-CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG-3')	20 basa
AML-1	(5'-ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA-3')	24 basa
AML-2	(5'-GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C-3')	22 basa

terlarut dengan baik maka ditambahkan *Ethidium Bromida* (EtBr). Selanjutnya dituangkan kedalam tangki mesin elektroforesis yang sudah dipasangkan sisir untuk membentuk sumur gel dan ditunggu hingga larutan beku. DNA produk PCR selanjutnya dimasukkan ke dalam masing-masing sumur gel yaitu sebanyak 3 µL secara berurutan sesuai dengan perlakuan dan ulangan, yaitu dimulai dari volume paling kecil hingga volume terbesar buffer ekstraksi DNA yang digunakan. Sumur pertama digunakan untuk DNA marker (GeneAid 100 bp).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini dilakukan percobaan menggunakan beberapa volume buffer ekstraksi InstaGene matrix yaitu 10 µL, 15 µL, 20 µL, dan 25 µL untuk mengisolasi DNA empat spesies FMA yang berbeda yaitu *Glomus* sp. isolat MV4, *Entrophospora* sp. isolat MV2, *Gigaspora* sp. isolat MV8, dan *Acaulospora* sp. isolat MV33. Untuk spora berukuran kecil diharapkan InstaGene volume 10 µL sudah mampu mengisolasi DNA yang dapat digunakan selanjutnya untuk proses identifikasi spesies mikoriza.

Untuk menentukan keberhasilan proses isolasi DNA menggunakan beberapa volume buffer ekstraksi InstaGene Matrix dalam penelitian ini adalah dengan melihat pita amplifikasi DNA pada produk PCR. Melalui hasil elektroforesis produk PCR dapat diketahui bahwa DNA yang telah diisolasi dari spora mikoriza berhasil atau tidak berhasil dilakukan serta dapat dilihat tingkat kemurnian DNA yang dihasilkan. Menurut (Vesty *et al.*, 2017) tingkat kemurnian DNA dapat

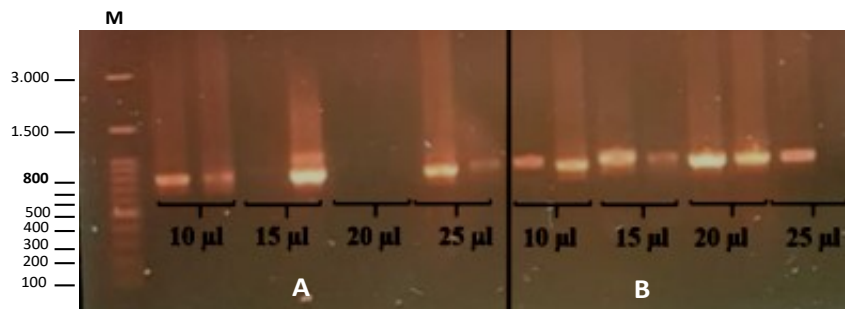
ditentukan dengan menggunakan ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) dimana DNA yang murni dikatakan murni atau bebas dari kontaminan-kontaminan jika ratio A260/280 nm berkisar antara 1,8 – 2,0.

Pasangan primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA hasil isolasi ini merupakan primer untuk identifikasi DNA mikoriza dengan metode *nested* PCR yaitu primer NS1 dan NS4 serta AML1 dan AML2, kedua primer ini adalah primer yang telah berhasil digunakan untuk identifikasi spora mikoriza (Na *et al.*, 2019). Gambar 1A, merupakan visualisasi hasil PCR DNA *Gigaspora* sp pada gel elektroforesis.

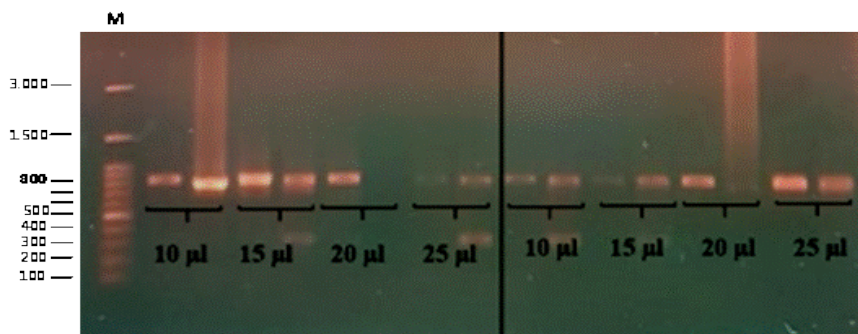
Gigaspora sp merupakan spesies mikoriza yang termasuk berukuran paling besar dibandingkan dengan spesies lainnya. Pada Gambar 1A diketahui bahwa amplifikasi DNA *Gigaspora* sp. dengan menggunakan primer AML1 dan AML2 berhasil dilakukan pada DNA hasil isolasi dengan menggunakan volume 10 µl, 15 µl, dan 25 µl dengan ukuran pita DNA yaitu sebesar 800 bp. Dari hasil visualisasi produk PCR melalui elektroforesis dapat dilihat bahwa tidak terdapat pita DNA pada sampel ulangan 1 dengan volume 15 µl. Hal yang sama terjadi pada sampel ulangan 1 dan 2 dengan volume 20 µl. Pada sampel ulangan 2 dengan volume 25 µl pita DNA yang terlihat lebih tipis daripada pita DNA pada ulangan 1. Tebal tipis nya pita DNA hasil PCR saat divisualisasikan pada gel elektroforesis ini dapat dipengaruhi oleh konsentrasi DNA awal yang digunakan sebagai DNA cetakan. Pita DNA yang tipis pada sampel volume 25 µl ulangan 2 menandakan konsentrasi DNA lebih rendah dibandingkan dengan ulangan 1. Berhasilnya proses

Tabel 2. Kondisi reaksi PCR untuk pasangan primer NS1 dan NS4

Reaksi	Temperatur (°C)	Waktu (menit)	Total siklus
<i>Pre-denaturation</i>	95	4	1
<i>Denaturation</i>	95	1	
<i>Annealing</i>	50	1	30
<i>Extension</i>	72	1	
<i>Final extension</i>	72	5	1



Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA *Gigaspora* sp. (A) dan *Glomus* sp. (B). M= Marker



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA *Acaulospora* sp. (A) dan *Entrophospora* sp. (B). M= Marker

amplifikasi DNA menandakan bahwa proses isolasi DNA sudah berhasil dilakukan.

Pada Gambar 1B menampilkan pita amplifikasi DNA mikoriza jenis *Glomus* sp. Pada Gambar ini dapat dilihat bahwa hampir semua volume InstaGene Matrix yang digunakan berhasil mengekstraksi DNA *Glomus* sp. kecuali sampel ulangan 2 dengan volume 25 µl. Sedangkan pada volume reaksi 15 µl DNA pada sampel ulangan 2 terlihat lebih tipis daripada sampel yang lainnya. Berdasarkan pada Gambar 1B tersebut diketahui bahwa semua volume InstaGene Matrix yang digunakan telah mampu mengisolasi DNA mikoriza mulai dari volume 10 µl, 15 µl, 20 µl, dan 25 µl meskipun terdapat pita pada beberapa volume buffer ekstraksi InstaGene yang terlihat lebih tipis namun volume 10 µl telah dapat digunakan untuk isolasi DNA mikoriza spesies *Glomus* sp.

Gambar 2 menyajikan foto gel elektroforesis hasil PCR FMA pada jenis *Acaulospora* sp. dan *Entrophospora* sp. Pada jenis *Acaulospora* sp. dapat dilihat bahwa pita DNA terlihat pada semua volume buffer ekstraksi, kecuali pada volume 20 µl ulangan kedua. Pada volume 25 µl ulangan 1, pita DNA muncul tetapi sangat tipis. Hal yang sama juga terlihat pada produk amplifikasi PCR sampel DNA jenis *Entrophospora* sp. pita DNA terlihat

pada semua volume buffer yang digunakan, meskipun pada perlakuan volume 15 µl ulangan 1 dan volume 20 µl ulangan 2 lebih tipis dan terlihat *smear* dibandingkan sampel lain.

Untuk keperluan identifikasi mikoriza secara molekuler dibutuhkan DNA sampel dengan kuantitas dan kualitas yang baik. Oleh karena itu prosedur serta bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi DNA perlu dioptimalkan sehingga selain produk yang bagus dapat dihasilkan namun juga secara ekonomis lebih menguntungkan. Isolasi DNA yang dilakukan pada penelitian ini adalah dengan menggunakan kit komersial InstaGeneTM Matrix (Bio-Rad). InstaGeneTM Matrix mengandung 6% w/v Chelex matrix yang dapat mengabsorpsi zat-zat terlarut hasil lisis sel yang berpotensi mengganggu proses amplifikasi PCR. Kojima *et al.* (2011) melakukan isolasi DNA fungi mikoriza menggunakan volume 20 µL InstaGene untuk semua jenis dan ukuran spora mulai dari yang berukuran kecil 40 µm (*Glomus* sp.) hingga yang berukuran besar 200 µm (*Gigaspora* sp.)

Hasil PCR juga dapat dipengaruhi oleh proses PCR yang berlangsung. Jika produk PCR yang dihasilkan mengandung banyak DNA yang tidak spesifik serta ukurannya bervariasi dan pita DNA tampak *smear* pada agarose gel, kondisi ini dikatakan bahwa terjadi gangguan pada PCR yang

Tabel 3. Kondisi reaksi PCR untuk pasangan primer AML1 dan AML2

Reaksi	Temperatur (°C)	Waktu (menit)	Total siklus
<i>Pre-denaturation</i>	95	4	1
<i>Denaturation</i>	95	1	
<i>Annealing</i>	58	1	30
<i>Extension</i>	72	1	
<i>Final extension</i>	72	5	1

telah dilaksanakan, bahkan kadang bisa juga menyebabkan tidak terbentuk pita sama sekali (Lorenz, 2012). Meskipun pita DNA hasil PCR terlihat tipis namun hal ini sudah membuktikan bahwa volume buffer ekstraksi dan prosedur isolasi DNA yang digunakan sudah berhasil untuk mengisolasi DNA mikoriza.

Tahapan amplifikasi DNA fungi mikoriza arbuskular yang telah diekstraksi dilakukan dengan teknik PCR menggunakan mesin thermocycler. Prinsip dasar dari alat ini adalah memperbanyak fragmen DNA target menggunakan bantuan oligonukleotida primer (Zein & Prawiradilaga, 2013). Pada penelitian ini digunakan dua pasang primer NS dan AML, dengan metode nested PCR. Metode ini adalah suatu teknik perbanyakan (replikasi) sampel DNA menggunakan bantuan enzim DNA polymerase yang menggunakan dua pasang primer untuk mengamplifikasi fragmen dengan menggunakan *nested* PCR, jika ada fragmen yang salah diamplifikasi maka kemungkinan bagian tersebut diamplifikasi untuk kedua kalinya oleh primer yang kedua. Dengan demikian, *nested* PCR adalah PCR yang sangat spesifik dalam melakukan amplifikasi. Meskipun waktu yang diperlukan lebih lama dibandingkan dengan teknik PCR biasa.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa volume buffer ekstraksi InstaGene Matrix 10 µl sudah cukup untuk mengekstraksi DNA dari spora FMA pada semua spesies yang diuji. Hal ini lebih ekonomis. Dari penelitian ini disarankan untuk melakukan pemurnian DNA terlebih dahulu sebelum digunakan untuk identifikasi spesies mikoriza secara molekuler.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Tulisan ini diterbitkan atas hibah penelitian yang berasal dari DIPA BLU Universitas Lampung

Tahun anggaran 2020. Ucapan terimakasih diberikan kepada semua pihak yang berkontribusi dalam pelaksanaan penelitian ini.

6. DAFTAR PUSTAKA

- Begum, N., C. Qin, M. A. Ahanger, S. Raza, M. I. Khan, M. Ashraf, N. Ahmed & L. Zhang. 2019. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation/ : Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.* 10: 1–15.
- Bever J. D, J. B. Morton, J. Antonovics & P. A. Schults. 2019. Host-Dependent Sporulation and Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in a Mown Grassland. *J. Ecol.* 84 (1): 71–82.
- Crossay, T., C. Antheau, D. Redecker, L. Bon, N. Chedri, L. Guentas, Y. Cavaloc & H. Amir. 2017. New Method for the Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi by Proteomic-Based Biotyping of Spores Using MALDI-TOF-M S. *Sci. Rep.* 7: 1–16.
- Deswiniyanti, N. W., N. Kadek & D. Lestari. 2017. Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Rhizosphere Soil of Several Grass Species and Cacao (*Theobroma cacao* L.) Based on its Spore Morphological Characteristics. *J. Bio sci. Biotechnol. Res. Asia.* 107 (1): 102–107.
- Diédhiou, A. G., W. L. Borges, O. Sadio & S. M. D. Faria. 2014. Acta Scientiarum Assessment of DNA Extraction Methods for Detection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Roots by Nested-PCR. *Acta Sci.* 36: 433–441.
- Lorenz, T. C. 2012. Polymerase Chain Reaction/ : Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* 22 (63): 1-14.
- Na, A., S. Kabirun, K. Fujiyama & D. Widiyanto. 2019. Molecular Identification and In Vitro Propagation of Arbuscular Mycorrhiza from Tea Plant Rhizosphere. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.* 9: 92–102.

- Nobuhito, N., K. Yuki & M. Yukio. 2011. Molecular Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Colonizing *Athyrium yokoscense* of the Ikuno Mine Site, Japan. *J. Jpn. Bot.* 86:73–81.
- Redecker, D., H. Isabelle & A. Wiemken. 2003. Molecular Identification of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Roots: Perspectives and Problems. *Folia geo bot.* 38: 113–124.
- Rini, M. V. & U. Efriyani. 2016. Respons Bibit Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq .) terhadap Pemberian Fungi Mikoriza Arbuskular dan Cekaman Air. *Menara Perkebunan.* 84 (2): 107–116.
- Sawaki, H., S. Koya & M. Saito. 1998. Phylogenetic Position of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Acaulospora gerdemannii*, and its Synanamorph *Glomus leptotichum*, Based Upon 18S rRNA Gene Sequence. *Mycoscience.* 39: 477–480.
- Sha, S. P., A. Anupama, P. Pradhan, G. S. Prasad & J. P. Tamang. 2016. Identification of Yeasts by Polymerase-Chain-Reaction-Mediated Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in Marcha, an Ethnic Amylolytic Starter of India. *Journal of Ethnic Foods.* 3 (4): 292–296.
- Song, Y., D. Chen, K. Lu, Z. Sun & R. Zeng. 2015. Enhanced Tomato Disease Resistance Primed by Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Front. Plant Sci.* 6: 786.
- Kojima, T., H. Sawaki & M. Saito. 2011. Detection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi , *Archaeospora Leptoticha*, and Related Species Colonizing Plant Roots by Specific PCR Primer Detection of Arbuscular Mycorrhizal Fungi , *Archaeospora*. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50 (1): 95–101.
- Vesty, A., K. Biswas, M. W. Taylor, K. Gear & R. G. Douglas. 2017. Evaluating the Impact of DNA Extraction Method on the Representation of Human Oral Bacterial and Fungal Communities. *PloS one.* 12 (1): 1–13.