

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pertambangan merupakan salah satu mata pencaharian penduduk Indonesia, mulai dari tambang emas, nikel, batu bara, bauksit, timah, hingga minyak bumi. Pertambangan dilakukan manusia dengan menggali, mengambil, dan mengolah sumber daya alam yang terdapat di perut bumi untuk memenuhi sebagian kebutuhan manusia (Sari, 2016). Dampak positif dari adanya keberadaan pertambangan rakyat yaitu, membuka atau menciptakan lapangan pekerjaan. Dengan adanya kegiatan pertambangan rakyat tentu saja dapat menarik minat masyarakat untuk ikut serta dalam melakukan kegiatan pertambangan rakyat dengan melihat keuntungan yang menjanjikan dari hasil penambangan khususnya emas. Selain itu juga bagi masyarakat yang tidak dapat menjadi pelaku penambangan rakyat dapat membuka usaha pada wilayah pertambangan (Sudiyarti, 2021). Salah satu pertambangan emas rakyat yang memiliki potensi yang besar adalah tambang emas yang ada di Maluku Utara di Desa Anggai, Pulau Obi (Liestianty dkk., 2023).

Mayoritas masyarakat menekuni profesi sebagai penambang emas sejak tahun 1995 hingga saat ini, dengan deposit emas yang ada belum diketahui cadangannya dengan pasti. Kelompok PESK menerapkan metode *gophering* (lobang tikus) mengikuti urat bijih yang memiliki kandungan ekonomis. Kegiatan pertambangan di Desa Anggai tidak hanya melibatkan warga asli disana, tetapi juga melibatkan pemodal yang datang dari luar Desa Anggai. Kegiatan pertambangan emas skala kecil di Desa Anggai menerapkan 3 metode pengolahan, yaitu pengolahan dengan metode amalgamasi, metode sianidasi serta gabungan dari keduanya (Firman dkk., 2022).

Aktivitas pertambangan emas seringkali menghasilkan produk logam sekunder sebagai limbah yang berbahaya bagi lingkungan seperti timbal, kadmium dan kromium. Selain itu, aktivitas penambangan emas menghasilkan limbah berupa merkuri (Liestianty, 2023). Tingginya konsentrasi merkuri pada suatu areal penambangan emas terjadi akibat pembuangan material atau lumpur tailing yang berasal dari hasil penggunaan merkuri dari pengolahan galian emas yang menyebabkan pencemaran lingkungan (Manullang dkk., 2021).

Akumulasi logam berat, khususnya merkuri dalam limbah berpotensi menimbulkan pencemaran lingkungan yang dapat mengakibatkan menurunnya kualitas kesuburan tanah karena tanah bekas tambang cenderung masam (Liestianty dkk., 2023). Hasil analisis sifat kimia tanah tambang emas yang dilakukan oleh Sunuk (2018) diperoleh hasil mempunyai kemasaman yang tinggi atau pH sangat rendah, C-organik, nitrogen, fosfor dan kalium yang tergolong sangat rendah.

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa pertambangan emas dapat meningkatkan konsentrasi logam berat seperti merkuri (Hg), arsen (As), dan kadmium (Cd) di lingkungan. Logam berat tersebut bersifat toksik dan bioakumulatif sehingga berisiko terhadap kesehatan manusia dan keberlanjutan ekosistem.

Keberadaan logam berat lain seperti arsen (As) dan kadmium (Cd) pada tanah turut memperburuk kualitas lingkungan. Arsen dan kadmium bersifat persisten dan dapat menurunkan kesuburan tanah serta menghambat pertumbuhan tanaman karena rendahnya kandungan fosfor (P) dalam tanah yang merupakan unsur esensial bagi tanaman karena merupakan faktor pembatas yang mempengaruhi pertumbuhan dan produksi tanaman (Dwinatalia dan Husamah, 2025).

Fosfor (P) merupakan salah satu unsur hara makro yang sangat penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Fosfor terdiri dari 0,2 hingga 0,8% dari berat kering tanaman dan ditemukan dalam asam nukleat, enzim, koenzim, nukleotida, dan fosfolipid (Asril dkk., 2023). Fosfor berhubungan dengan mekanisme biokimia yang menyimpan energi dan kemudian memindahkannya ke dalam sel-sel hidup dan berpartisipasi dalam fosforilasi berbagai senyawa intermediat dalam proses fotosintesis dan respirasi (Zulkifli, 2020). Selain itu fosfor berperan sebagai aktivator berbagai enzim metabolisme tanaman dan merupakan komponen klorofil. Fosfor juga pembentuk adenosindifosfat (ADP) dan adenosintrifosfat (ATP), dua senyawa yang terlibat dalam transformasi energi yang paling signifikan (Firniasari, 2018).

Peran fosfor yang sangat penting bagi tanaman ternyata tidak diikuti ketersediaannya yang cukup di tanah. Menurut Sugianto (2019) bahwa fosfor total pada tanah memiliki konsentrasi yang tinggi namun ketersediaannya terbatas untuk diserap oleh tanaman. Hasil penelitian Asril (2023) menyebutkan kandungan fosfor rata-rata dalam tanah sekitar 0,05% dengan hanya 0,1% dari jumlah tersebut dalam bentuk tersedia untuk digunakan oleh tanaman.

Salah satu alternatif yang bisa digunakan untuk membantu meningkatkan ketersediaan fosfat dalam tanah yaitu dengan menggunakan mikroorganisme pelarut fosfat. Kelompok mikroorganisme tersebut yaitu jamur pelarut fosfat. Jamur umumnya memiliki aktivitas pelarutan fosfat lebih tinggi dibanding bakteri karena jamur dapat menghasilkan lebih banyak asam seperti glukonat, sitrat, laktat, 2 - ketogluconic, oxalic dan tartarat (Pane dkk., 2022).

Isolat jamur pelarut fosfat kedepannya akan diaplikasikan di areal penambangan emas perlu dilakukan isolasi dan identifikasi sebagai tahap awal. Isolasi diharapkan akan menghasilkan isolat atau biakan murni jamur pelarut fosfat untuk diidentifikasi jenisnya, dan dievaluasi kemampuannya dalam melarutkan fosfat. Informasi jamur pelarut fosfat dari lahan penambangan emas, khususnya di Pulau Obi belum ada sehingga penelitian ini perlu dilakukan.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu :

1. Mengisolasi jamur pelarut fosfat yang berasal dari tanah areal penambangan emas rakyat Pulau Obi, Maluku Utara.
2. Mengetahui potensi pelarutan fosfat isolat jamur pelarut fosfat dari tanah areal penambangan emas rakyat Pulau Obi, Maluku Utara.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada akademisi dan praktisi mengenai keanekaragaman jamur pelarut fosfat serta potensi pemanfaatannya pada tanah dari pertambangan emas dikawasan Pulau Obi, Maluku Utara.

1.4 Teori

Wilayah Pertambangan Rakyat (WPR) merupakan suatu area pertambangan yang telah ditetapkan oleh pemerintah sebagai wilayah pertambangan yang dikelola oleh masyarakat untuk kemakmuran masyarakat lokal. WPR memberikan potensi sumberdaya lokal baik masyarakat di sekitar tambang maupun mineral logam emas dapat dikelola secara berdaya guna dan berhasil guna serta berkelanjutan di wilayah yang sudah ada kegiatan penambangan emas tradisional. Usaha penambangan bahan tambang mineral seperti emas telah memberikan sumbangan terhadap pendapatan daerah dan terciptanya lapangan kerja. Pengelolaan pertambangan bahan tambang ini khususnya penambangan rakyat masih sangat memprihatinkan. Sebagian besar usaha penambangan rakyat tidak memperhatikan tata lingkungan, baik pada saat masih beroperasi maupun setelah tidak beroperasi lagi. Keadaan ini mengakibatkan perubahan bentuk lahan dan berpotensi menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan seperti terjadinya gerakan massa tanah dan/atau batuan, pencemaran tanah dan air terutama lingkungan sekitar area penambangan (Santoso dan Gomaeruzzaman, 2018).

Penambangan emas selain menghasilkan emas sebagai produk utamanya, juga menghasilkan limbah berupa tanah bekas pengolahan (tailing). Tailing berupa padatan semacam pasir yang sangat halus atau dalam bentuk *slurry*, yaitu padatan yang bercampur dengan air membentuk lapisan tipis. Pada umumnya, tailing sangat miskin unsur hara terutama nitrogen (N), fosfor (P), dan kalium (K), sehingga diperlukan strategi pengolahan tailing menjadi lebih produktif (Syofiani dan Oktabriana, 2017). Strategi yang digunakan untuk memenuhi ketersediaan unsur hara khususnya fosfor dalam tanah dapat dilakukan menggunakan metode biologi yaitu dengan adanya pemberian mikroba berupa jamur pelarut fosfat.

Jamur pelarut fosfat adalah jamur yang mampu mengubah fosfat yang berada dalam tanah dari bentuk senyawa (sulit terlarut) menjadi bentuk ion (mudah terlarut) sehingga dapat dimanfaatkan oleh tanaman. Jamur yang mampu untuk melarutkan fosfat biasanya berasal dari kelas Deuteromycetes. Jamur pelarut fosfat yang umum ditemukan dalam tanah yaitu jamur genus *Aspergillus* dan *Penicillium*. (Asril dkk., 2014). Jamur pelarut fosfat yang dominan ditemukan di tanah masam yang ada di Indonesia yaitu antara lain *Aspergillus niger* dan *Penicillium*. *Aspergillus awamori*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. foetidus*, *A. wentii*. *Fusarium oxysporum*, *Alternaria teneius*, *Achrothcium sp.* *Penicillium digitatum*, *P lilacinum*, *P balaji*. *P funiculosun*. *Cephalosporium sp.* *Cladosprium sp.*, *Curvularia lunata*. *Cunnighamella*, *Candida sp.*, *Chaetomium globosum*, *Humicola instens*, *Humicola lanuginosa*, *Helminthosporium sp.*, *Paecilomyces fusisporous*, *Pythium sp.*, *Phoma sp.*,

Populospora mytilino, *Myrothecium roridum*, *Mortierella* sp., *Micromonospora* sp., *Oideodendron* sp., *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Trichoderma viridae*, *Torula thermophila*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Sclerotium rolfsii* (Asril dkk.2014).

Mekanisme pelarutan fosfat secara kimia merupakan jalur utama yang dimanfaatkan oleh mikroorganisme dalam melarutkan fosfat. Mikroorganisme ini melepaskan berbagai asam organik bermolekul rendah, seperti oksalat, suksinat, tartrat, sitrat, laktat, α -ketoglutarat, asetat, formiat, propionat, glikolat, glutamat, glioksilat, malat, dan fumarat. Akumulasi asam-asam organik tersebut dapat menyebabkan penurunan pH pada lingkungan. Selain itu, penurunan pH juga dapat terjadi akibat pelepasan asam sulfat dan asam nitrat yang dihasilkan dari proses oksidasi kemoautotrofik sulfur dan amonium. Sementara itu, pelarutan fosfat secara biologis berlangsung melalui aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroorganisme, terutama enzim fosfatase dan fitase. Dalam proses mineralisasi bahan organik, senyawa fosfat organik diuraikan menjadi fosfat anorganik yang dapat diserap tanaman dengan bantuan enzim fosfatase. Enzim ini berperan memutus ikatan fosfat dari senyawa organik sehingga fosfat menjadi tersedia bagi tanaman dan dapat tumbuh dengan optimal (Ginting dkk., 2006).

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Oktober 2025. Isolasi dan identifikasi jamur pelarut fosfat dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi PKR Mikroba Karst, Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Alat dan Bahan Penelitian

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *laminary air flow* (LAF), cawan petri, *autoclaf*, oven, mikro pipet, erlenmeyer, kaca preparat, *beaker glass*, gelas ukur, tabung reaksi, *Hot plate magnetic stirrer*, Mikroskop, spektrofotometer, vortex, penggaris, box, timbangan analitik, rak tabung reaksi, tip, bunsen, spatula, kamera, foto box, pemantik api, sentrifuge, pengayak diameter 1ml, shaker, botol, dan alat tulis.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alkohol 70%, aquades, *handscoon*, *tissue*, *plastic wrapping*, *aluminium foil*, label, *potato dextrose broth* (PDB), L-tryptophan, IAA murni, reagen swalkovski, media pikovskaya, pereaksi P pekat, kertas saring, *lactophenol cotton blue*, dan sampel tanah yang diambil dari pertambangan emas Pulau Obi, Maluku Utara.

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Persiapan Sampel

Sampel tanah diambil dari beberapa lokasi yaitu dari hutan alam, tambang lama, tambang baru, limbah tong lama, limbah tong baru dan kebun pada area tambang emas di Pulau Obi, Maluku Utara. Selanjutnya, dilakukan pengayakan menggunakan saringan berukuran diameter 1 ml. Kemudian sampel yang telah diayak dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge dan disimpan ke dalam freezer.

2.3.2 Pembuatan Media Pikovskaya Jamur Pelarut Fosfat (P)

Bahan untuk pembuatan media padat pikovskaya dapat dilihat pada Tabel 1, (ditimbang sesuai kebutuhan).

Tabel 1. Komposisi media Pikovskaya dalam 250 mL aquades

Nama Bahan	Jumlah (g)	Nama Bahan	Jumlah (g)
Glukosa	2,5	NaCl MnSO ₄ H ₂ O	0,000625
Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,25	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,025
Yeast Ekstrak	0,125	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,000625
NaCl (NH ₄) ₂ SO ₄	0,05	MnSO ₄ H ₂ O (NH ₄) ₂ SO ₄	0,125

KCI	0,05	Agar	5
-----	------	------	---

Bahan yang telah ditimbang dicampur kedalam labu erlenmeyer. Satu liter aquades ditambahkan kedalam labu erlenmeyer. Bahan yang telah ditimbang beserta 250 mL aquades dalam erlenmeyer dihomogenkan menggunakan *hot plate magnetic stirrer*. Bahan media tersebut di sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 20 menit. Media yang telah disterilisasi, dikeluarkan dan dinginkan pada *laminary air flow* hingga hangat-hangat kuku. Antibiotik *chloramphenicol* 0,125 g dimasukkan pada media sebelum melakukan penuangan. Sebagian media dituang secara aseptik ke dalam cawan Petri steril, kemudian digoyang/geser hingga permukaan media merata, dan didiamkan hingga mengeras lalu di *wrapping*. Media pikovskaya ini merupakan media yang digunakan untuk pemurnian hasil isolasi jamur pelarut P.

2.3.3 Isolasi Jamur Pelarut Fosfat (P)

Adapun teknik isolasi jamur pelarut P yaitu menggunakan metode tuang (*pour plate method*) bersamaan dengan pembuatan dan penuangan media pikovskaya pada cawan petri dengan tingkat pengenceran 10^{-2} sampai 10^{-4} dengan prosedur, media pikovskaya disterilkan, kemudian 1 g sampel tanah ditimbang dan dimasukkan ke dalam 9 ml aquades steril dengan menggunakan tabung reaksi, kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Deret pengenceran dibuat berurutan dari 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} . 1 ml larutan dari pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} masing-masing di pipet dan secara aseptik dituang ke dalam cawan petri bersamaan dengan penuangan media pikovskaya yang telah didiamkan tadi menggunakan metode *pour plate*, ratakan hingga larutan merata di seluruh permukaan cawan. Hasil isolasi pada media pikovskaya didiamkan hingga mengeras lalu di *wrap*. Setiap cawan petri diberi label sesuai dengan besar pengenceran, selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar selama 3-7 hari. Koloni yang tumbuh pada 3 pengenceran terakhir di media pikovskaya dihitung jumlah koloninya berdasarkan warna atau bentuk koloni. Hasil isolasi tersebut kemudian ditandai dengan memberi kode.

2.3.4 Perhitungan Jumlah Mikroba Suatu Sampel TPC (Total Plate Count)

Pengujian jumlah mikroba suatu sampeTPC dilakukan dengan menghitung adanya pertumbuhan koloni mikroorganisme yang tumbuh pada suatu media yang dibuat dengan cara tuang (*pour plate*). Menurut SNI 2897:2008, jika jumlah koloni <25 koloni, maka perhitungan jumlah populasi jamur pada cawan diambil pada tingkat pengenceran terendah (10^{-2}), kemudian jumlah rata-rata koloni dari 2 ulangan pengenceran tersebut dikalikan dengan faktor pengenceran dan diberi tanda (*) jika kurang dari jumlah koloni 25-250. Rumus dari perhitungan total jumlah koloni (TPC), yaitu:

$$\text{Nilai TPC} = \text{Jumlah Rata - Rata Koloni} \times \frac{1}{10^{-2}}$$

2.3.5 Pemurnian Jamur Pelarut Fosfat (P)

Pertumbuhan koloni jamur diamati setelah 3-7 hari inkubasi. Dan diamati koloni yang memiliki zona bening (halozone) pada media pikovskaya, Secara aseptik koloni yang telah dipilih diambil menggunakan ose steril, dan digoreskan pada media agar, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 3-7 hari. . Beri kode atau label isolat pada setiap isolat jamur pelarut fosfat dan simpan di dalam alat pendingin (*refrigerator*) pada suhu 5° C. Pada tahap ini dilakukan pengamatan morfologi koloni dan pengukuran diameter koloni, serta zona bening untuk penghitungan indeks kelarutan P.

2.3.6 Perhitungan Zona Bening Jamur Pelarut Fosfat (P)

Tiap isolat ditumbuhkan pada media uji dan diinkubasi selama 7 hari. Koloni yang tumbuh dan mampu membentuk zona bening diindikasikan sebagai isolat yang mampu melarutkan fosfat. Pengukuran zona bening yang terbentuk dilakukan dengan menggunakan penggaris milimeter. Aktivitas mikroba diperoleh dengan mengukur zona bening pada media padat dan menjadi petunjuk ada atau tidaknya mikroorganisme yang tumbuh pada setiap perlakuan pada sekitar isolat. Berdasarkan zona bening dapat diketahui indeks kelarutan fosfat (diameter zona bening/diameter koloni).

2.3.7 Perhitungan Indeks Pelarut Fosfat (P)

Pembentukan zona bening dari hasil pemurnian koloni jamur, diukur menggunakan penggaris kemudian dihitung indeks kelarutan fosfat dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Sharon dkk., 2016).

$$\text{Indeks Pelarut Fosfat} = \frac{\text{Diameter Koloni} + \text{Diameter Zona Bening}}{\text{Diameter Koloni}}$$

Standar indeks pelarut fosfat berdasarkan Marra dkk. (2011).

IPF kategori rendah : < 2.00

IPF kategori sedang : > 2.50

IPF kategori tinggi : > 4.00

2.3.8 Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Jamur Pelarut Fosfat (P)

Pada pengamatan makroskopis, dilakukan dengan mengamati karakteristik makroskopik masing-masing koloni jamur dengan melihat warna (depan dan belakang), ukuran diameter koloni, diameter zona bening, bentuk, tekstur, elevasi, dan tepi koloni. Sedangkan identifikasi mikroskopis, dilakukan dengan mengamati bentuk, hifa, sporangium dan konidiospora dengan menggunakan mikroskop. Spora yang digunakan dapat diambil dari hasil isolasi jamur sebelumnya yang telah dimurnikan. Pertama, kaca objek dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alkohol 70%, kemudian spora hasil isolasi jamur diambil menggunakan ose dan diletakkan diatas kaca objek. Kemudian diberi setetes aquadest di atasnya, lalu ditutup menggunakan kaca penutup dan diamati bentuk serta panjang spora di bawah mikroskop. Identifikasi makroskopis dan mikroskopis dilakukan dengan

mencocokkan karakteristik jamur yang diperoleh dari hasil pengamatan dengan buku identifikasi *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* dari Watanabe (2002).

2.3.9 Pembuatan Media Uji IAA dan Kelarutan Fosfat

2.3.9.1 Pembuatan Media Uji IAA

Media Cair Pengujian IAA yakni PDB (Potato Dextrose Broth) kemudian tambahkan L-Tryptophan sebagai prekursor untuk produksi IAA oleh jamur. Dipanaskan media cair hingga seluruh bahan kimia terlarut sempurna. Kemudian media dimasukkan ke dalam botol kaca sebanyak 20 ml/botol. Ditutup botol kaca menggunakan alumunium foil, kemudian plastik, dan diikat dengan karet. Media disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 0,1 MPa dan suhu 121°C selama 20 menit. Simpan media 5 – 7 hari sebelum digunakan untuk memastikan sterilitas dari setiap media yang dibuat.

2.3.9.2 Pembuatan Media Uji Kelarutan Fosfat

Media cair pengujian kelarutan fosfat yakni Pikovskaya Cair dengan komposisi glukosa 10 g, Ca_3HPO_4 5 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KCL 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, ekstrak Khamir 0.5 g, MnSO_4 25 mg dan FeSO_4 25 mg, 1000 ml aquades. dipanaskan media Pikovskaya cair hingga seluruh bahan kimia terlarut sempurna. Kemudian bagi media ini ke dalam botol kaca sebanyak 20 ml/botol. Ditutup botol kaca menggunakan alumunium foil, kemudian plastik, dan diikat dengan karet kemudian Sterilkan media menggunakan autoklaf pada tekanan 0,1 MPa dan suhu 121°C selama 20 menit. Simpan media 5 – 7 hari sebelum digunakan untuk memastikan sterilitas dari setiap media yang dibuat.

2.3.10 Pembuatan P pekat

Pereaksi P pekat diperlukan sebagai reagen saat melakukan uji kelarutan fosfat, cara membuatnya yaitu dengan cara, ditimbang 12 g ammonium molibdat $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$. Dilarutkan bahan tersebut dalam 100 mL akuades dalam labu ukuran 1 L. Diaduk hingga larutan menjadi transparan dan semua kristal larut sempurna. Ditimbang 0.277 g kalium antimonil tartrat $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}]$. Dilarutkan kalium antimonil tartrat dalam larutan ammonium molibdat yang telah disiapkan sebelumnya. Ditambahkan akuades hingga volume mencapai 1 liter. Diaduk campuran hingga semua bahan tercampur rata. Setelah larutan tercampur merata, pereaksi P pekat siap digunakan. Simpan larutan ini dalam botol kaca yang tertutup rapat untuk mencegah penguapan atau kontaminasi. Disarankan untuk menyimpan pereaksi ini di tempat yang gelap, karena ammonium molibdat dapat terdegradasi jika terkena cahaya langsung. Saat akan digunakan, pisahkan 50 ml Pereaksi P Pekat dan tambahkan dengan asam askorbat sebanyak 0,53 gram.

2.3.11 Uji Kandungan Hormon IAA

Uji kandungan hormon IAA dilakukan dengan isolat jamur murni dikulturkan pada 20 ml media Pikovskaya cair yang telah ditambahkan triptofan. Kultur jamur di inkubasi pada suhu ruang di atas shaker dengan kecepatan 150 rpm selama ± 72 jam. Larutan PDB kemudian diambil 12 ml dan disentrifugasi selama 15 menit dengan

kecepatan 6000 rpm untuk memisahkan media dan mikroba. Supernatan diambil 4 ml dan ditambahkan 1 ml reagen salkowski di dalam tabung reaksi. Larutan diinkubasi pada ruangan gelap selama 30 menit untuk mengamati perubahan warna. Larutan kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang (λ) 520 nm dan blanko menggunakan salkowski. Nilai absorbansi yang didapatkan digunakan untuk menghitung konsentrasi IAA menggunakan rumus pada kurva standar IAA. Konsentrasi fosfat dari sampel di hitung berdasarkan kurva standar dengan standar IAA.

2.3.12 Uji Kelarutan Fosfat

Uji kelarutan fosfat dilakukan dengan isolat jamur murni dikulturkan pada 20 ml media Pikovskaya cair. Kultur jamur diinkubasi pada suhu ruang di atas shaker dengan kecepatan 150 rpm selama $\pm$ 72 jam. Larutan PDB kemudian diambil 12 ml dan disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6000 rpm untuk memisahkan media dan mikroba. Supernatan diambil 5 ml dan ditambahkan 0,5 ml pereaksi P pekat yang telah ditambahkan asam askorbat di dalam tabung reaksi. Larutan diinkubasi pada ruangan gelap selama 30 menit untuk mengamati perubahan warna. Larutan kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang (λ) 693 nm dan blanko menggunakan *lactophenol cotton blue*. Nilai absorbansi yang didapatkan digunakan untuk menghitung konsentrasi kelarutan fosfat menggunakan rumus pada kurva standar kelarutan fosfat. Konsentrasi fosfat dari sampel di hitung berdasarkan kurva standar dengan standar PO_4 .