



A M Tangapo*, S M Mambu

¹ Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Sam Ratulangi Jl. Kampus Unsrat, Bahu, Manado, 95115.

*Email: <u>agustina.tangapo@unsrat.ac.id</u> (email corresponding author)

Abstrak

Ubi cilembu merupakan salah satu komoditas pertanian yang unggul karena rasa manis dan mengeluarkan madu yang khas ketika dipanggang. Komoditas ini memiliki spesifikasi lokasi dalam proses budidayanya. Jamur rhizosfer merupakan salah satu sumber senyawa aktif baru seperti enzim ekstraseluler. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi jamur dari tanah rhizosfer ubi cilembu yang dibudidayakan di Desa Cilembu Sumedang Jawa Barat dan melakukan penapisan terhadap isolat jamur rhizosfer sebagai penghasil enzim ekstraseluler amilase dan selulase. Penapisan sebagai penghasil amilase dilakukan menggunakan medium yang mengandung substrat pati, dan sebagai penghasil selulase menggunakan medium yang diperkaya dengan Carboxy-methylcellulose (CMC). Hasil penelitian menunjukkan dari 23 isolat jamur rhizosfer ubi cilembu terseleksi 13 isolat potensial sebagai penghasil enzim amilase dan 8 isolat yang berpotensi sebagai penghasil enzim selulase.

Kata kunci: glukosa, hidrolisis pati, hidrolisis selulosa, komunitas mikroba

1. PENDAHULUAN

Enzim merupakan biokatalis yang berperan penting dalam semua tahap metabolisme dan berbagai reaksi biokimia. Pemanfaatan enzim dalam menghidrolisis polimer telah banyak dikembangkan di bidang industri maupun pertanian sebagai upaya efisiensi produksi. Enzim amilase dan selulase merupakan enzim yang telah digunakan dalam menghidrolisis polimer karbohidrat. Kedua enzim ini telah banyak digunakan dalam industri seperti di bidang pulp dan kertas, pertanian, pakan hewan, obat-obatan, fermentasi dan makanan (Gurung dkk., 2013; Raveendran dkk., 2018). Enzim mikroba diketahui merupakan enzim yang dominan diaplikasikan dalam industri komersial. Selain itu, perkembangan penelitian enzim yang dihasilkan mikroba terus berkembang sampai saat ini mulai dari isolasi dari sumber-sumber baru, karakterisasi, rekayasa sampai produksi dan aplikasi skala bio-industri (Nigam, 2013).

Rhizosfer merupakan daerah di sekitar perakaran tanaman yang kaya akan kehadiran mikroba. Hal ini terjadi karena di daerah rhizosfer tersedia nutrien yang melimpah bagi mikroba yang merupakan hasil eksudat perakaran tanaman tersebut. Mikroba rhizosfer menghasilkan berbagai macam enzim hidrolitik dan fitohormon untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman (Choubane dkk., 2016; Lasa dkk., 2019; Utami dkk., 2020). Enzim hidrolitik tersebut merupakan enzim ekstraseluler yang dilepaskan oleh mikroba ke lingkungan, sehingga rhizosfer menjadi salah satu sumber yang menjanjikan untuk eksplorasi mikroba penghasil enzim ekstraseluler termasuk amilase dan selulase.

Enzim amilase merupakan enzim yang diaplikasikan sebagai katalis dalam memecah pati menjadi senyawa yang lebih sederhana. Amilase merupakan enzim yang telah diaplikasikan di berbagai bidang industri yang terus berkembang sampai saat ini (Niyonzima, 2019). Aplikasi bioteknologi yang memanfaatkan amilase terus dieksplorasi untuk meningkatkan nilai ekonomi dari berbagai sumber pati yang menjadi substrat dari enzim ini. Enzim selulase merupakan enzim yang dimanfaatkan dalam hidrolisis substrat selulosa. Kedua enzim hidrolitik ini dapat dihasilkan oleh jamur rhizosfer.

Ubi cilembu adalah varietas ubi jalar dengan karakteristik dengan rasa manisnya yang khas. Varietas ini menjadi komoditas penting untuk diversifikasi pangan non beras. Namun demikian, lokasi asal termasuk faktor tanah tempat budidaya tanaman ini diduga mempengaruhi kualitas ubi jalar cilembu (Solihin dkk., 2017). Jamur dapat berasosiasi dengan akar tanaman pada habitat tanah (*bulk soil*), pada daerah rhizosfer maupun di endosfer sebagai bakteri endofit. Jamur yang hidup di

A.1

habitat rhizosfer merujuk pada jamur yang habitatnya di tanah sekitar perakaran tanaman dan aktivitasnya masih dipengaruhi oleh eksudat akar tumbuhan inangnya. Sejauh ini, eksplorasi jamur rhizosfer dari tanaman ubi cilembu belum pernah dilakukan. Selain spesifisitas tumbuhan inang, faktor tanah lokasi budidaya ubi cilembu di desa asalnya Desa Cilembu Sumedang yang ikut mempengaruhi kualitas rasa manis pada komoditas ini juga diasumsikan ikut mempengaruhi komunitas jamur rhizosfernya. Jamur rhizosfer yang berasosiasi dengan tanaman juga merupakan sumber enzim hidrolitik seperti amilase dan selulase yang dihasilkan sebagai kontribusinya secara ekologis. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi jamur rhizosfer tanaman ubi cilembu yang dibudidayakan di desa asalnya yaitu Desa Cilembu Sumedang Jawa Barat dan dieksplorasi secara kualitatif kemampuan amilolitik dan selulolitik dari isolat jamur rhizosfer tersebut.

2. METODOLOGI

Isolasi dan Peremajaan Jamur Rhizosfer

Metode yang digunakan dalam isolasi jamur rhizosfer ini adalah metode cawan sebar (*spread-plate*). Sampel tanah rhizosfer ubi cilembu yang dibudidayakan di Desa Cilembu Sumedang Jawa Barat, diambil sebanyak 10 gram, dilarutkan pada 90 ml NaCl 0,9% steril, dicampur dengan vortex dan dilakukan pengenceran berseri sampai pengenceran 10⁻⁶. Selanjutnya, pada setiap pengenceran diambil 100 μL suspensi bakteri dan disebar di atas medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) secara merata (Shinkafi dan Gobir, 2018). Selanjutnya, diinkubasi selama 3-7 hari pada suhu 30°C. Setiap pengenceran dilakukan pengulangan sebanyak dua kali. Setelah masa inkubasi, dilakukan pemisahan dan pemurnian isolat jamur rhizosfer yang berhasil diisolasi dengan memindahkan setiap isolat yang berbeda karakteristik morfologinya ke medium PDA baru.

Jamur rhizosfer yang diisolasi dari tanah rhizosfer tanaman ubi cilembu dan telah dimurnikan dilanjutkan untuk analisis kualitatif amilase dan selulase. Seluruh isolat jamur rhizosfer sebelum diuji aktivitas enzim ekstraselulernya, terlebih dahulu diremajakan pada media PDA dan diinkubasi selama 5-7 hari pada suhu 30°C.

Penapisan sebagai Penghasil Amilase

Pengujian aktivitas jamur sebagai penghasil enzim amilase dilakukan secara kualitatif dengan pengamatan zona bening di sekitar isolat jamur yang ditumbuhkan pada medium *Glucose Yeast Extract Pepton* (GYP) yang terdiri dari glukosa 1 g/L, yeast ekstrak 0,1 g/L, pepton 0,5 g/L, agar 16 g/L dan ditambahkan *soluble starch* (0,2 %) sebagai substrat (Sunitha dkk., 2012). Setelah masa inkubasi selama 3-5 hari, ketika isolat jamur menunjukkan pertumbuhan, kultur tersebut diuji dengan menggunakan larutan iodin. Aktivitas amilase akan ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening disekitar isolat jamur, sedangkan medium yang akan menunjukkan warna biru tua. Pengujian pada setiap isolat dilakukan pengulangan sebanyak tiga pengulangan.

Penapisan sebagai Penghasil Selulase

Pengujian aktivitas jamur sebagai penghasil enzim selulase dilakukan dengan menumbuhkan isolat pada medium GYP dengan penambahan 0,5% *Carboxymethylcellulose* (CMC) dan diinkubasi selama 3-5 hari. Setelah masa inkubasi atau pada saat isolat menunjukkan pertumbuhan, kultur diuji dengan menggunakan reagen *congo red* 0,2% yang dituangkan pada medium yang telah ditumbuhkan isolat jamur rhizosfer dan diinkubasi selama 15-20 menit, kemudian dibilas dengan larutan 1M NaCl (Rajput dkk., 2016; Verma dan Verma, 2016). Aktivitas selulase akan ditunjukan dengan adanya zona bening di sekitar isolat, sedangkan medium akan menunjukkan warna merah. Pengujian pada setiap isolat dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

Indeks Enzim Amilase dan Selulase

Pengujian kualitatif aktivitas enzim ekstraseluler amilase dan selulase dinyatakan dalam indeks enzim yang diperoleh dari perbandingan diameter zona bening dengan diameter isolat jamur pada setiap media pengujian (Verma dan Verma, 2016). Diameter zona bening menunjukkan diameter zona hidrolisis substrat yang terkandung pada media.



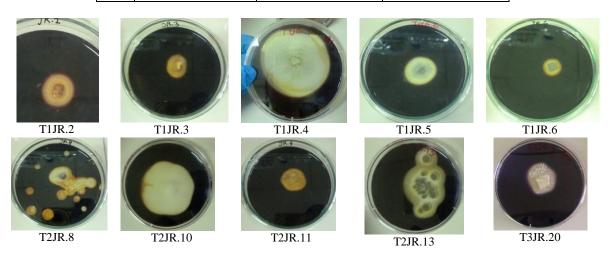
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil isolasi jamur dari tanah rhizosfer ubi cilembu yang dilakukan pada penelitian ini berhasil memperoleh 23 (dua puluh tiga) jenis jamur rhizosfer yang berbeda karakteristik morfologinya pada medium PDA. Berdasarkan hasil uji aktivitas enzim ekstraseluler yang dilakukan terhadap 23 jamur rhizosfer ubi cilembu diperoleh bahwa 13 isolat memiliki aktivitas amilolitik atau dapat menghasilkan amilase dan 8 isolat memiliki aktivitas selulolitik atau dapat menghasilkan selulase (Tabel 1). Terdapat 6 (enam) isolat jamur rhizosfer yang menunjukkan kemampuan dapat menghasilkan kedua enzim baik amilase maupun selulase, yaitu T1JR3, T1JR4, T1JR5, T1JR6. T2JR8, dan T2JR10 (Gambar 1 dan Gambar 2).

Berdasarkan hasil pengukuran indeks enzim yang dinyatakan dengan perbandingan diameter zona bening dengan zona bening isolat jamur, diperoleh bahwa kisaran indeks aktivitas amilase berkisar antara 1-1,67 dan yang memiliki indeks tertinggi yaitu isolat T2JR13. Indeks enzim selulase berkisar antara 1,04-2,44 dan yang tertinggi ditunjukkan oleh isolat T1JR5.

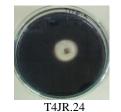
Tabel 1. Indeks enzim amilase dan selulase dari isolat jamur rhizosfer ubi cilembu

macks chem annuse and setulase and isolat jumat imposite abi			
No.	Isolat jamur rhizoser	Indeks enzim amilase	Indeks enzim selulase
1.	T0JR.A	0	0
2.	T0JR.B	0	0
3.	T0JR.D	0	0
4.	T1JR.1	0	$1,63 \pm 0,04$
5.	T1JR.2	$1,33 \pm 0$	0
6.	T1JR.3	1 ± 0	$1,13 \pm 0,06$
7.	T1JR.4	$1,35 \pm 0,21$	$1,10\pm0,01$
8.	T1JR.5	$1,55 \pm 0,07$	$2,44 \pm 0,31$
9.	T1JR.6	1 ± 0	$1,09 \pm 0$
10.	T2JR.8	$1,38 \pm 0,18$	$1,05 \pm 0,01$
11.	T2JR.10	1 ± 0	$1,04 \pm 0,04$
12.	T2JR.11	1 ± 0	0
13.	T2JR.12	0	$1,42 \pm 0,02$
14.	T2JR.13	$1,67 \pm 0,01$	0
15.	T3JR.16	0	0
16.	T3JR.17	0	0
17.	T3JR.18	0	0
18.	T3JR.19	0	0
19.	T3JR.20	1 ± 0	0
20.	T4JR.21	1 ± 0	0
21.	T4JR.23	0	0
22.	T4JR.24	$1,43 \pm 0,13$	0
23.	T4JR.25	$1,19 \pm 0,05$	0



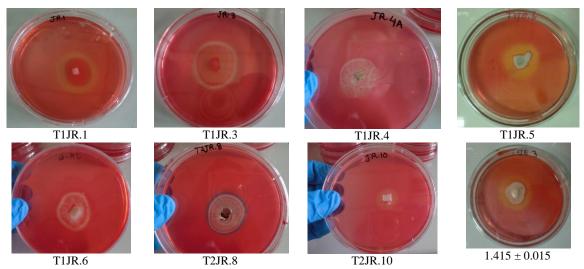








Gambar 1. Hasil uji positif aktivitas amilase yang dihasilkan oleh jamur rhizosfer ubi cilembu



Gambar 2. Hasil uji positif aktivitas selulase yang dihasilkan oleh jamur rhizosfer ubi cilembu

Penapisan kualitatif yang dilakukan terhadap isolat-isolat jamur rhizosfer untuk mengetahui apakah isolat jamur tersebut dapat menghasilkan enzim ekstraseluler amilase dan selulase. Uji kualitatif amilase dilakukan dengan menggunakan indikator lugol's iodine. Daerah pada medium di luar zona bening akang menunjukkan warna biru tua keunguan (Gambar 1) apabila ditetesi dengan lugol's iodine. Hal ini karena larutan ini bereaksi sensitif dengan pati yang terkandung pada medium yang tidak dihidrolisis. Untuk penapisan kualitatif selulase dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan reagen congo red dan medium yang mengandung CMC yang umumnya dilakukan untuk uji selulase. CMC yang digunakan dalam medium merupakan polimer dengan bobot molekul tinggi yang menyebabkannya tidak dapat ditranspor ke dalam sel mikroba. Hal ini menyebabkan untuk mendegradasi CMC ini enzim yang harus dilepaskan ke luar sel sehingga selulase yang dihasilkan oleh isolat jamur disekresikan ke luar sel dan berdifusi di permukaan agar. Tahap pewarnaan dengan congo red untuk mendeteksi substrat CMC pada medium yang ditandai dengan warna merah (Gambar 2), sedangkan zona bening menunjukkan substrat yang dihidrolisis oleh enzim selulase yang dihasilkan dan dikeluarkan oleh isolat jamur. Metode ini merupakan metode penapisan awal yang dapat memperoleh hasil secara cepat dan sensitif. Larutan congo red berinteraksi secara kuat dengan ikatan β-1,4-glikosidik (Khoirunnisa dkk., 2020).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa isolat-isolat jamur rhizosfer ubi cilembu yang diperoleh mempunyai aktivitas amilolitik dan selulolitik. Jamur yang memiliki aktivitas amilolitik memiliki kemampuan menghasilkan enzim amilase dan aktivitas selulolitik memiliki kemampuan enzim selulase yang disekresikan ke lingkungannya. Hasil penapisan kualitatif yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan kisaran indeks amilolitik maupun selulolitik yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan dari setiap isolat dalam menghasilkan enzim amilase dan selulase dalam menghidrolisis substrat pati dan selulosa pada medium.

Enzim selulase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis ikatan glikosidik pada molekul selulosa dengan produk akhir glukosa. Selulosa umumnya merupakan sisa dari organisme yang dapat diuraikan oleh mikroba menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana yang dapat berguna sebagai hara bagi tumbuhan dan organisme tanah lainnya. Telah banyak kelompok Fungi yang



diidentifikasi memiliki kemampuan untuk menghasilkan enzim ini (Karunasinghe dkk., 2020; Verma dan Verma, 2016; Wisdawati dkk., 2021). Kemampuan jamur rhizosfer untuk dalam menghasilkan enzim selulase menunjukkan bahwa kelompok jamur ini berkontribusi dalam siklus karbon. Isolat jamur yang mampu menghasilkan enzim selulase ikut berkontribusi dalam proses dekomposisi yang terjadi di dalam tanah terutama di daerah sekitar perakaran.

Selain aktivitas selulolitik, jamur rhizosfer juga dapat menghasilkan amilase yang dapat menghidrolisis pati. Amilase berfungsi sebagai katalis untuk menghidrolisis substrat pati menjadi molekul yang lebih sederhana seperti maltosa atau glukosa dalam metabolisme (Sunitha dkk., 2012). Jamur amilolitik yang diisolasi dari sumber kaya pati umumnya berpotensi menghasilkan isolat positif yang lebih banyak dan amilase yang lebih baik. Ubi cilembu yang merupakan tanaman yang kaya akan pati menjadi sumber nutrisi bagi mikroba yang hidup berasosiasi dengannya baik sebagai endofit maupun di sekitar perakaran dan umbi pada tanah rhizosfer yang merupakan kandidat utama yang dapat berkolonisasi menjadi endofit (Tangapo dkk., 2018).

Jamur yang berasosiasi dengan tumbuhan seperti pada daerah rhizosfer merupakan salah satu sumber enzim hidrolitik yang berperan penting secara ekologis. Jamur selulolitik berperan dalam proses dekomposisis dan perubahan bahan organik. Hidrolisis selulosa pada tanaman merupakan bagian penting dalam siklus karbon global. Aktivitas selulolitik melibatkan selulase yang merupakan enzim penting dalam invasi dan kolonisasi akar tanaman. Jamur dengan aktivitas selulolitik dan amilolitik dapat berkontribusi dalam proses dekomposisi bahan organik dan pemacu pertumbuhan tanaman serta berperan penting dalam menekan penyakit dengan penghambatan patogen tanah (Mambu dkk., 2018; Wang dkk., 2020).

Enzim dapat diperoleh dari tumbuhan, hewan maupun dari kelompok mikroba. Namun demikian, enzim yang dihasilkan oleh mikroba memiliki beberapa keunggulan antara lain dapat dikontrol dan direkayasa dengan lebih mudah, waktu yang lebih cepat, dan produksi skala besar yang lebih mudah. Selain itu, biaya produksi yang relatif lebih rendah dibandingkan dengan produksi skala besar untuk enzim selain dari mikroba (Dar dkk., 2014; de Souza dan e Magalhães, 2010).

4. KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah berhasil mengisolasi 23 isolat jamur rhizosfer tanaman ubi cilembu dan diperoleh 13 isolat memiliki aktivitas amilolitik dan 8 isolat memiliki aktivitas selulolitik atau dapat menghasilkan selulase. Terdapat 6 (enam) isolat jamur rhizosfer yang menunjukkan kemampuan dapat menghasilkan kedua enzim baik amilase maupun selulase, yaitu T1JR3, T1JR4, T1JR5, T1JR6. T2JR8, dan T2JR10. Jamur rhizosfer yang memiliki kemampuan menghasilkan amilase dan selulase secara kualitatif dapat dieksplorasi lebih lanjut untuk dikembangkan sebagai sumber enzim hidrolitik dari jamur rhizosfer.

DAFTAR PUSTAKA

- Choubane, S., Cheba, B. A., & Benourrad, A. (2016). Screening and Phenotypic Diversity of Amylase Producing Rhizospheric Bacteria from Some North African Plants. *Procedia Technology*, 22, 1197–1204. https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.01.168
- Dar, G. H., Kamili, A. N., Nazir, R., Bandh, S. A., & Malik, T. A. (2014). *Biotechnological production of α -amylases for industrial purposes: Do fungi have potential to produce α amylases?* 5(July), 35–40. https://doi.org/10.5897/IJBMBR2014.0196
- de Souza, P. M., & e Magalhães, P. de O. (2010). Application of microbial α-amylase in industry a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A broader view: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013. https://doi.org/10.1155/2013/329121
- Karunasinghe, T. G., Maharachchikumbura, S. S. N., Velazhahan, R., & Al-Sadi, A. M. (2020). Antagonistic Activity of Endophytic and Rhizosphere Fungi Isolated from Sea Purslane (*Sesuvium portulacastrum*) against *Pythium* Damping off of Cucumber. *Plant Disease*, 104(8), 2158–2167. https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0003-RE
- Khoirunnisa, S. A., Oetari, A., & Sjamsuridzal, W. (2020). Carboxymethyl cellulose (CMC)-



- degrading ability of *Rhizopus azygosporus* UICC 539 at various temperatures. *AIP Conference Proceedings*, 2242(Cmc), 2–7. https://doi.org/10.1063/5.0007875
- Lasa, A. V., Mašínová, T., Baldrian, P., & Fernández-López, M. (2019). Bacteria from the endosphere and rhizosphere of *Quercus* spp. Use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter. In *PLoS ONE* (Vol. 14, Issue 3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214422
- Mambu, S., Sugihara, S., Kawame, T., Nishigaki, T., Toyota, K., Miyamaru, N., Tanaka, H., & Kanekatsu, M. (2018). Effect of green manure application on soil enzyme activity and nutrient dynamics in a sugarcane field of Kitadaito, Okinawa, Japan. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 52(4), 315–324. https://doi.org/10.6090/jarq.52.315
- Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, *3*(3), 597–611. https://doi.org/10.3390/biom3030597
- Niyonzima, N.F. (2019). Production of Microbial Industrial Enzymes. *Acta Scientific Microbiology*, 2(12), 75–89. https://doi.org/10.31080/asmi.2019.02.0434
- Rajput, K., Chanyal, S., & Agrawal, P. K. (2016). Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree-Cupressus torulosa D. Don. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *5*(7), 1034–1054. https://doi.org/10.20959/wjpps20167-7137
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S. B., Abraham, A., Mathew, A. K., Madhavan, A., Rebello, S., & Pandey, A. (2018). Applications of microbial enzymes in food industry. *Food Technology and Biotechnology*, *56*(1), 16–30. https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491
- Shinkafi, S., & Gobir, M. (2018). Isolation and identification of Rhizosphere Mycoflora of *Lycopersicum Esculentum* (tomato). *Advances in Plants & Agriculture Research*, 8(6), 512–515. https://doi.org/10.15406/apar.2018.08.00377
- Solihin, M. A., Sitorus, S. R. P., Sutandi, A., & Widiatmaka, W. (2017). Karakteristik Lahan Dan Kualitas Kemanisan Ubi Jalar Cilembu. *Jurnal Pengelolaan Sumberdaya Alam Dan Lingkungan (Journal of Natural Resources and Environmental Management)*, 7(3), 251–259. https://doi.org/10.29244/jpsl.7.3.251-259
- Sunitha, V. H., Ramesha, A., Savitha, J., & Srinivas, C. (2012). *Amylase production by endophytic fungi*. 1213–1221.
- Tangapo, A. M., Astuti, D. I., & Aditiawati, P. (2018). Dynamics and diversity of cultivable rhizospheric and endophytic bacteria during the growth stages of cilembu sweet potato (*Ipomoea batatas* L. var. cilembu). *Agriculture and Natural Resources*. https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.10.003
- Utami, A. D., Wiyono, S., Widyastuti, R., & Cahyono, P. (2020). Keanekaragaman Mikrob Fungsional Rizosfer Nanas dengan Berbagai Tingkat Produktivitas. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia*, 25(4), 584–591. https://doi.org/10.18343/jipi.25.4.584
- Verma, P., & Verma, R. K. (2016). Screening of Cellulase Production by Fungal Isolates from Rhizosphere Region of Mine Degraded Land in Dalli-Rajhara (Chhattishgarh). *International Journal of Basic and Applied Biology*, 3(2), 162–165.
- Wang, B. T., Hu, S., Yu, X. Y., Jin, L., Zhu, Y. J., & Jin, F. J. (2020). Studies of cellulose and starch utilization and the regulatory mechanisms of related enzymes in Fungi. *Polymers*, 12(3), 1–17. https://doi.org/10.3390/polym12030530
- Wisdawati, E., Kuswinanti, T., Rosmana, A., & Nasruddin, A. (2021). Screening and identification of cellulolytic fungi at rhizosphere of safira taro plant. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 807(2), 8–13. https://doi.org/10.1088/1755-1315/807/2/022041