



**IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI ENDOFIT DAUN
KESAMBI (*Schleichera oleosa*) DAN KETAPANG
(*Terminalia catappa*) BERDASARKAN rDNA
ITS (*INTERNAL TRANCRIBED SPACER*)**

SKRIPSI

Oleh :

**Merlin Masruroh
NIM 140210103080**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN IPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI ENDOFIT DAUN
KESAMBI (*Schleichera oleosa*) DAN KETAPANG
(*Terminalia catappa*) BERDASARKAN rDNA
ITS (*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER*)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan (S1) pada Program Studi Pendidikan Biologi

Oleh:

**Merlin Masruroh
NIM 140210103080**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN BIOLOGI
JURUSAN PENDIDIKAN MATEMATIKA DAN IPA
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah *Azza Wa Jalla* yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, saya persembahkan skripsi ini kepada :

1. Allah *Azza Wa Jalla*, sebagai ungkapan syukur atas nikmat dan pertolongan dan karunia yang tak ada habisnya, doa saya kepada-Nya agar apa yang saya lakukan di skripsi ini berguna bagi seluruh umat manusia.
2. Bapak Miarno dan Ibu Herlina yang telah dengan ikhlas menerima saya sebagai amanah dari Allah dan telah membesarkan, mendidik, mendoakan saya dengan kasih sayang yang tidak akan pernah bisa saya balas, mengorbankan segala sesuatu tanpa mengharap balasan apapun kecuali kebahagiaan dan keselamatan saya di dunia dan akhirat;
3. Almamater Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember yang saya banggakan.

MOTTO

“Dan carilah pada apa yang telah dianugerahkan Allah kepadamu (kebahagiaan) negeri akhirat, dan janganlah kamu melupakan bahagianmu dari (kenikmatan) duniawi”
(Terjemah QS. Al Qashshah: 77)

“...Seandainya semua umat manusia bersatu untuk memberikan suatu kebaikan kepadamu, mereka tidak akan mampu kecuali yang sudah ditetapkan Allah untukmu. Dan seandainya semua umat manusia bersatu untuk mencelakakanmu, mereka tidak mampu kecuali keburukan yang telah ditetapkan oleh Allah untukmu. Pena sudah diangkat dan tinta sudah kering.”
(Rasulullah Muhammad)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Merlin Masruroh

NIM : 140210103080

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (*Schleichera Oleosa*) Dan Ketapang (*Terminalia Catappa*) Berdasarkan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*)” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 21 November 2018

Yang menyatakan,

Merlin Masruroh

NIM 140210103080

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI ENDOFIT DAUN
KESAMBI (*Schleichera oleosa*) DAN KETAPANG
(*Terminalia catappa*) BERDASARKAN rDNA
ITS (*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER*)**

Oleh :

**Merlin Masruroh
NIM 140210103080**

Dosen Pembimbing Utama : Erlia Narulita M.Si., Ph.D.

Dosen Pembimbing Anggota : Siti Murdiyah S.Pd., M.Pd.

PERSETUJUAN

**IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI ENDOFIT DAUN
KESAMBI (*Schleichera oleosa*) DAN KETAPANG (*Terminalia
catappa*) BERDASARKAN rDNA ITS (*INTERNAL
TRANCRIBED SPACER*)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan (SI) pada Program Studi Pendidikan Biologi

Oleh

Nama Mahasiswa : Merlin Masruroh
NIM : 140210103080
Jurusan : Pendidikan MIPA
Program Studi : Pendidikan Biologi
Angkatan Tahun : 2014
Daerah Asal : Jember
Tempat, Tanggal Lahir : Jember, 4 April 1996

Disetujui Oleh

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Erlia Narulita M.Si., Ph.D.
NIP. 19800705 200604 2 004

Siti Murdiah S.Pd., M.Pd.
NIP. 19790503 2006042 001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (*Schleichera Oleosa*) Dan Ketapang (*Terminalia catappa*) Berdasarkan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*)” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan pada:

Hari/Tanggal :

Tempat : Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

Tim Penguji

Ketua,

Sekretaris,

Erlia Narulita M.Si., Ph.D.

NIP. 19800705 200604 2 004

Siti Murdiah S.Pd., M.Pd.

NIP. 19790503 2006042 001

Anggota I,

Anggota II,

Prof. Dr. Joko Waluyo, M.Si.

NIP. 19571028 198503 1 001

Vendi Eko Susilo, S.Pd., M.Si.

NRP. 760015709

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

Prof. Drs. Dafik, M.Sc., Ph.D.

NIP. 19680802 199303 1 004

RINGKASAN

Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) Dan Ketapang (*Terminalia catappa*) Berdasarkan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*); Merlin Masruroh, 140210103080; 2018; 56 halaman; Program Studi Pendidikan Biologi, Jurusan Pendidikan MIPA, Universitas Jember.

Kesambi memiliki potensi bidang farmakologis yaitu dapat digunakan sebagai antikanker, antioksidan dan antimikroba. Beberapa organ dari kesambi telah digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit pada manusia seperti nyeri, penyakit kulit, borok, disentri, gigitan ular, dan melindungi dari malaria. Sedangkan ketapang dapat digunakan untuk nyeri sendi, disentri, sariawan, diuretik, kardiovaskuler, kulit, liver, pernafasan, gonorrhea, dan insomnia.

Beragam khasiat yang dimiliki kesambi dan ketapang disebabkan kandungan metabolit sekunder terutama pada bagian daunnya. Namun ekstraksi dan pemurnian zat metabolit aktif dari tanaman obat membutuhkan biomassa yang besar serta melalui pengambilan sampel yang destruktif. Sehingga dibutuhkan alternatif lain untuk mengambil khasiat pada kedua tanaman obat tersebut tanpa harus merusak tatanan ekologis mereka di alam.

Setiap tanaman tingkat tinggi memiliki beberapa mikroba endofit, salah satunya fungi endofit yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif atau metabolit sekunder sebagai akibat transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam fungi endofit. Fungi endofit berhasil diisolasi dari tanaman kesambi dan ketapang yang berasal dari Taman Nasional Baluran. Total isolat yang ditemukan adalah 2 isolat dari Kesambi (*Schleichera oleosa*) dan 1 isolat dari Ketapang (*Terminalia catappa*) yang selanjutnya disebut dengan KS₁, KS₂ dan KT₁. Identifikasi molekuler dilakukan untuk mendapat hasil yang lebih teliti dan akurat. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi spesies fungi endofit apa saja yang terdapat pada tanaman ketapang (*Terminalia catappa*) dan tanaman kesambi (*Schleichera oleosa*) secara molekuler.

Tahap awal yaitu peremajaan fungi endofit yang telah diperoleh sebelumnya kemudian dilanjutkan ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA tiga sampel fungi endofit menggunakan metode SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) kemudian hasil ekstraksi dirunning elektroforesis dan divisualisasikan dengan UV transiluminator. Selanjutnya dilakukan amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan mesin PCR untuk amplifikasi daerah ITS rDNA sampel fungi endofit daerah ITS1 dan ITS2 menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5.

Hasil penelitian menunjukkan pada tahap PCR ketiga sampel berhasil *diannealing* pada suhu yang berbeda yaitu sampel KS₁ pada suhu 41,5°C, KS₂ pada suhu 55,1°C, dan KT pada suhu 53,4°C. Setelah amplifikasi PCR, dilanjutkan proses purifikasi oleh PT. Genetika Science kemudian dilanjutkan tahap sekuensing oleh FirstBASE Laboratory hingga didapat gambar kromatogram kemudian dianalisa dan dicocokkan dengan sekuen nukleotida database fungi yang terdapat pada *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Isolat KS₁ menunjukkan kemiripan yang paling tinggi dengan sekuen *Microascus gracilis* sehingga dapat teridentifikasi sebagai spesies *Microascus gracilis*, sedangkan isolat KS₂ menunjukkan kemiripan yang paling tinggi dengan sekuen *Rhizopus microspores* sehingga teridentifikasi sebagai spesies *Rhizopus microsporus*, dan isolat KT menunjukkan kemiripan yang paling tinggi dengan sekuen *Rhizomucor pusillus* sehingga teridentifikasi sebagai spesies *Rhizomucor pusillus*. Hasil analisis filogenik menunjukkan bahwa ketiga fungi endofit tersebut memiliki kekerabatan yang jauh karena memiliki banyak perbedaan karakter-karakter genetik.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah Azza Wa Jalla yang telah melimpahkan rahmat dan pertolonganNya sehingga penulisan skripsi dengan judul “Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) Dan Ketapang (*Terminalia catappa*) Berdasarkan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*)”.

Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) Dan Ketapang (*Terminalia catappa*) Berdasarkan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dapat terselesaikan. Skripsi ini digunakan untuk melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan dan mencapai gelar Sarjana Pendidikan (S1) pada Program Studi Pendidikan Biologi Jurusan Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Jember.

Penulisan menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dafik, M.Sc., Ph.D., selaku Dekan FKIP Universitas Jember;
2. Dr. Dwi Wahyuni, M.Kes., selaku Ketua Jurusan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam FKIP Universitas Jember;
3. Dr. Iis Nur Asyiah, S.P., M.P., selaku Ketua Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Universitas Jember;
4. Erlia Narulita M.Si., Ph.D. dan Siti Murdiah S.Pd., M.Pd., selaku Pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian serta memberi dukungan penuh dalam penulisan skripsi ini;
5. Prof. Dr. Joko Waluyo, M.Si., dan Vendi Eko Susilo, S.Pd., M.Si., selaku Dosen Penguji sidang skripsi;
6. M. Amien Rais, Dewi Masruroh, Lalli Nur Hasanah, Aria Bashori, mbak Dina, Siti Rosida, Fiqih Ramadhan, Luluk Mukarramah, atas bantuannya selama penelitian di Laboratorium MIPA;
7. Rika Dwi Kurniaputri, Zahra Puspa, Ken Izmi selaku teman yang menemani selama mengerjakan skripsi;
8. Sahabat Ukhuwah (Nury Qurrota A'yun, Fatmawati Ningsih, Fikri Ainur Risma, Alfi Nur Hikmah, Ken Izmi Sasmi, Anindita Kumalasari, Syarifatul Lutfia), big

love to you all, *jazakunallah khairan* atas nasihat, ilmu, penguatan iman sehingga mengingatkan bahwa meskipun yang diutamakan akhirat namun tidak melupakan urusan dunia, sedunia sesurga ya insyaAllah;

9. Sahabat Quran (Ustadzah Asma', Mbak El, Mbak Juhria, Ruly, Zumah, Dias dll), *jazakunallah khairan* selama ini kebersamaannya dalam mempelajari dan menghafal Quran, semoga kita diberikan kemampuan untuk menjaga kitabullah sehingga di akhirat kelak kita dapat memberi mahkota untuk orang tua kita masing-masing Aamiin;
10. Teman-teman Hijrah (Rani, dek Arin, Ukhti Syafira, ukhti Chyla, ukhti Kurniya, ukhti Febi, ukhti Mutiara, Warda, mbak Dea, Mbak Cahya, Dek Fina, mbak Dewi, mbak Kiki, mba Syafira, Ade, ibu-ibu pengajian dr. Anik dan masjid Al Muttaqin), *jazakunallah khairan* atas kebersamaannya menuntut ilmu akhiratnya;
11. Teman-teman Pendidikan Biologi 2014 atas kenangan selama perkuliahan, praktikum, studi lapang, dan responsi yang penuh perjuangan dan tidak akan pernah terlupakan;
12. Serta semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini.

Penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun guna penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bias bermanfaat sebagaimana mestinya.

Jember, November 2018

Penulis

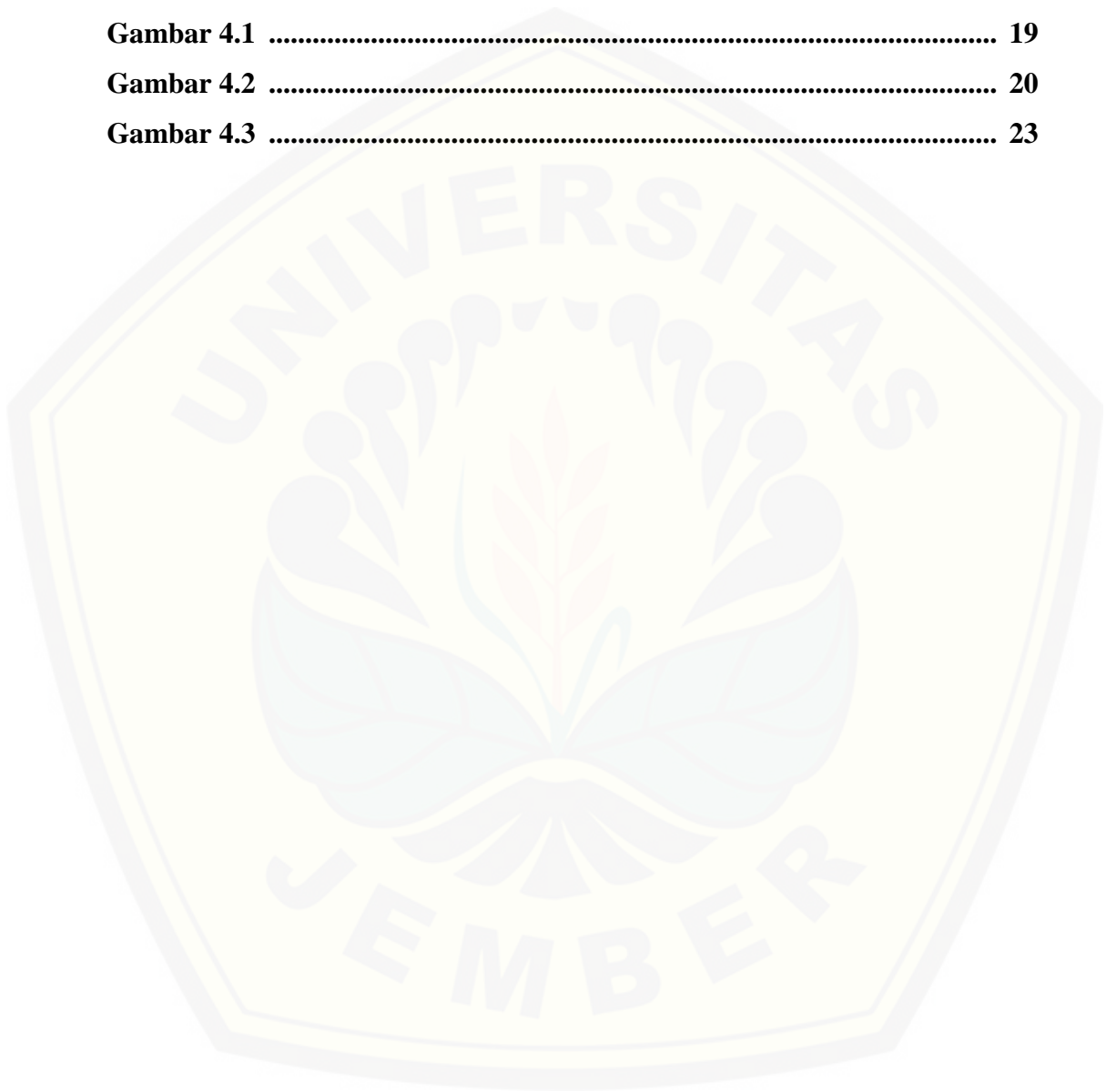
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PERSETUJUAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.5 Batasan Masalah	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Fungi Endofit	5
2.1.1 Pengertian Fungi Endofit	5
2.1.2 Potensi Fungi Endofit	6
2.2 Karakter Makroskopis dan Mikroskopis	7
2.3 Taksonomi Fungi Endofit	8
2.4 Identifikasi Molekuler Fungi Endofit	10
2.5 Kerangka Konseptual	12
BAB 3. METODE PENELITIAN	13
3.1 Jenis Penelitian	13
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.3 Variabel Penelitian	13

3.4 Definisi Operasional	13
3.5 Alat dan Bahan Penelitian	14
3.5.1 Alat	14
3.5.2 Bahan	15
3.6 Prosedur Penelitian	15
3.6.1 Peremajaan Fungi	15
3.6.2 Ekstraksi DNA	15
3.6.3 Amplifikasi DNA	16
3.6.4 Elektroforesis	16
3.7 Alur Penelitian	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1 Hasil Penelitian	19
a. Ekstraksi DNA dan Elektroforesis	19
b. Amplifikasi PCR dan Elektroforesis	19
c. Hasil Analisis Sekuensing DNA	20
d. Hasil Multiple Sequences Alignments	22
4.2 Pembahasan	23
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	30
5.1 Kesimpulan	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	42

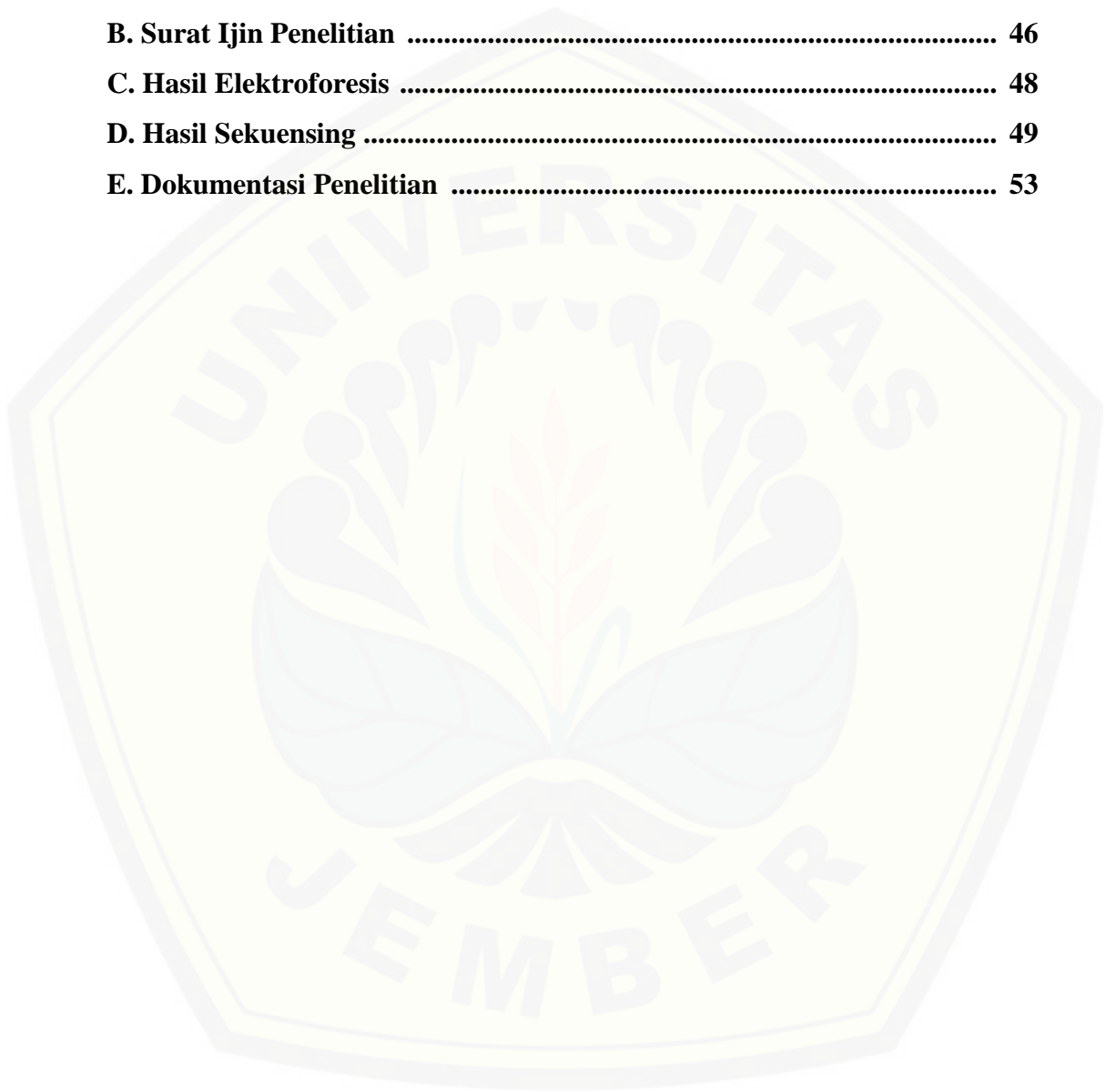
DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	8
Gambar 4.1	19
Gambar 4.2	20
Gambar 4.3	23



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Matriks Penelitian	42
B. Surat Ijin Penelitian	46
C. Hasil Elektroforesis	48
D. Hasil Sekuensing	49
E. Dokumentasi Penelitian	53



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dewasa ini banyak pemanfaatan ekstraksi tanaman sebagai obat untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Beberapa contoh tanaman yang memiliki manfaat sebagai obat yaitu kesambi (*Schleichera oleosa*) dan ketapang (*Terminalia catappa*).

Kesambi termasuk keluarga tanaman Sapindaceae merupakan salah satu tumbuhan hutan lokal, bermanfaat serbaguna (*multi purpose*), bernilai ekonomis dan sangat potensial. Pada bidang industri biji kesambi yang dapat menghasilkan minyak berpotensi digunakan sebagai biodiesel (Silitonga, 2015). Selain itu, kayu pohon digunakan untuk alat-alat pertanian, gerobak, dalam pekerjaan konstruksi berat, untuk pembuatan kapal, oli, bajak dan berbagai kegunaan lainnya (Anuragi, 2017). Sedangkan potensi bidang farmakologis kesambi dapat digunakan sebagai antikanker, antioksidan dan antimikroba (Meshram, 2015). Beberapa organ dari kesambi telah digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit pada manusia seperti nyeri, penyakit kulit, borok, disentri, gigitan ular, dan melindungi dari malaria (Panda, 2014; Patra, 2012; Mahaptma dan Sahoo, 2008; dan Ghosh, 2011).

Ketapang merupakan salah satu tanaman anggota suku Combretaceae yang memiliki nilai guna yang sangat banyak. Potensi yang dimiliki ketapang adalah minyak yang dihasilkan oleh biji ketapang dapat digunakan sebagai industri minyak nabati, minyak pangan, bahan baku industri sabun, lilin dan minyak pelumas (Agatemor, 2006). Selain itu, potensi bidang farmakologis ketapang dapat digunakan untuk nyeri sendi, disentri, sariawan, diuretik, kardiovaskuler, kulit, liver, pernafasan, gonorrhoea, dan insomnia (Pauly, 2001; dan Thomson *et al.*, 2006).

Beragam khasiat yang dimiliki kesambi dan ketapang disebabkan kandungan metabolit sekunder terutama pada bagian daunnya. Daun kesambi mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin, fenolik, dan tannin

(Situmeang, 2016). Sedangkan pada daun ketapang antara lain seperti flavonoid, alkaloid, tannin, triterpenoid/steroid, resin, saponin (Riskitavani dan Purwani, 2013). Namun, perlu diketahui ekstraksi dan pemurnian zat metabolit aktif dari tanaman obat membutuhkan biomassa yang besar serta melalui pengambilan sampel yang destruktif (Murdiyah, 2017). Selain itu potensi pohon kesambi diberbagai sektor juga menyebabkan eksploitasi pohon ini cukup besar hingga menyebabkan populasi pohon kesambi menurun sangat cepat (Sinha, 2012). Populasi pohon ketapang juga semakin menurun dikarenakan banyaknya patogen yang menyebabkan penyakit di berbagai organ tubuhnya (Boyogueno, 2010). Sehingga dibutuhkan alternatif lain untuk mengambil khasiat pada kedua tanaman obat tersebut tanpa harus merusak tatanan ekologis mereka di alam (Murdiyah, 2017).

Fungi endofit dianggap sebagai sumber metabolisme sekunder baru yang menawarkan alternatif eksploitasi potensi medis, pertanian, dan industri secara langsung pada metabolit sekunder pada tanaman (Strobel *et al.*, 2003). Fungi endofit adalah fungi atau fungi yang hidup berkoloni di dalam jaringan tanaman dan tidak memberikan dampak negatif pada tumbuhan inangnya (Bacon *et al.*, 2000). Fungi endofit umumnya memproduksi metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat seperti misalnya senyawa-senyawa anti kanker, anti virus, atau anti bakteri (Noverita, 2009) dan metabolit sekunder yang dihasilkan memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa dari tumbuhan inangnya (Prihatiningtias, 2005).

Isolasi fungi endofit dari daun kesambi dan ketapang telah berhasil dilakukan (Murdiyah, 2017) yaitu isolat fungi endofit kesambi (KS₁ dan KS₂) berjumlah dua spesies dan satu spesies fungi endofit ketapang (KT₁) yang semuanya belum teridentifikasi jenis spesiesnya. Sehingga diperlukan identifikasi terhadap isolat fungi endofit dari daun kesambi dan ketapang. Identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis memiliki kelemahan karena kurang akuratnya hasil data sehingga diperlukan identifikasi metode lainnya yang lebih teliti dalam mengidentifikasi identitas organisme, yaitu metode identifikasi molekuler (Rahayu, 2015).

Identifikasi molekuler dapat dilakukan menggunakan daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) ribosomal DNA (rDNA). Sekuen rDNA region ITS memiliki variasi sekuen relatif tinggi pada gen rDNA tiap spesies, sehingga sangat baik digunakan untuk identifikasi tingkat genus hingga spesies (Buchan *et al.*, 2002). Isolasi DNA dan amplifikasi PCR pada daerah ITS rDNA merupakan tahap awal yang perlu dilakukan dalam identifikasi molekuler (Rahayu, 2015).

Salah satu hasil yang diperoleh dari mengidentifikasi secara molekuler adalah sekuens DNA yang selain dapat dianalisis hingga dapat diketahui tingkatan taksonnya, namun juga mengetahui pendekatan filogenetiknya (Suparman, 2012). Filogenetik molekuler merupakan suatu metode yang sering digunakan hampir disemua cabang biologi untuk perbandingan genom dan untuk mengetahui hubungan antar spesies berdasarkan pohon kehidupan melalui perhitungan statistika urutan basa (Yang dan Rannala 2012).

Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti bermaksud melakukan penelitian berjudul “Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (*Schleichera oleosa*) Dan Ketapang (*Terminalia catappa*) Berdasarkan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Spesies fungi endofit apa saja yang terdapat pada daun ketapang (*Terminalia catappa*) dan kesambi (*Schleichera oleosa*) berdasarkan analisis rDNA ITS?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

Mengidentifikasi spesies fungi endofit apa saja yang terdapat pada tanaman ketapang (*Terminalia catappa*) dan tanaman kesambi (*Schleichera oleosa*).

1.4 Manfaat Penelitian

Beberapa manfaat yang dapat diambil dari hasil penelitian ini sebagai berikut:

1. Peneliti, hasil penelitian ini dapat memberikan wawasan mengenai spesies fungi endofit yang terdapat pada tanaman kesambi (*Schleichera oleosa*) dan tanaman ketapang (*Terminalia catappa*) dan pemanfaatan fungi endofit kedua tanaman tersebut di bidang farmakologi.
2. Bidang akademik, hasil penelitian ini dapat memberikan informasi dan database spesies fungi endofit yang terdapat pada tanaman kesambi (*Schleichera oleosa*) dan tanaman ketapang (*Terminalia catappa*).
3. Peneliti lain, hasil penelitian ini dapat memberikan pengetahuan dalam melakukan penelitian dan dapat menjadi acuan untuk penelitian lebih lanjut mengenai spesies fungi endofit yang terdapat pada tanaman kesambi (*Schleichera oleosa*) dan tanaman ketapang (*Terminalia catappa*).

1.5 Batasan Masalah

Untuk mempermudah pembahasan dalam menafsirkan masalah yang terkandung didalam penelitian ini, maka permasalahan yang dibahas dibatasi dalam:

- a. Fungi endofit yang digunakan adalah isolat KS₁ (Kesambi 1), KS₂ (Kesambi 2), dan KT₁ (Ketapang 1) yang telah diisolasi oleh Siti Murdiyah tahun 2017.
- b. Identifikasi molekuler khusus untuk fungi endofit adalah menggunakan primer ITS4 dan ITS5.
- c. Karakter molekuler diamati berdasarkan DNA pengkode ITS1 dan ITS2.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fungi Endofit

2.1.1 Pengertian Fungi Endofit

Fungi endofit adalah fungi atau fungi yang hidup berkoloni di dalam jaringan tanaman dan tidak memberikan dampak negatif pada tumbuhan inangnya (Bacon, 2000). Setiap tanaman tingkat tinggi memiliki beberapa mikroba endofit, salah satunya fungi endofit yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif atau metabolit sekunder sebagai akibat transfer genetik dari tanaman inangnya ke dalam fungi endofit (Tan dan Zou, 2001). Metabolit sekunder yang dikandung memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat seperti misalnya sebagai anti kanker, anti virus, atau anti bakteri (Noverita, 2009) dan metabolit sekunder yang dihasilkan memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa dari tumbuhan inangnya (Prihatiningtias, 2005).

Fungi endofit hidup dan tumbuh didalam jaringan tanaman seperti akar, batang, atau daun (Sherwood & Carroll, 1974; Carroll, 1988; Stone *et al.*, 2004). Kelompok fungi endofit kebanyakan adalah kelompok polifiletik dari ascomycetes, sedangkan yang termasuk basidiomycetes, deuteromycetes dan oomycetes jarang ditemukan (Saikkonen *et al.*, 1998; Arnold, 2007).

Ditinjau dari sisi taksonomi dan ekologi, fungi endofit merupakan organisme yang sangat heterogen. Petrini *et al.* (1992) menggolongkan fungi endofit dalam kelompok Ascomycotina dan Deuteromycotina. Strobell *et al.* (1996) mengemukakan bahwa fungi endofit meliputi genus Pestalotia, Pestalotiopsis, Monochaetia, dan lain-lain.

Clay (1988) melaporkan, bahwa fungi endofit dimasukkan dalam famili Balansiae yang terdiri dari 5 genus yaitu Atkinsonella, Balansiae, Balansiopsis, Epichloe dan Myriogenospora. Genus Balansiae umumnya dapat menginfeksi tumbuhan tahunan dan hidup secara simbiosis mutualistik dengan tumbuhan inangnya. Dalam simbiosis ini, fungi dapat membantu proses penyerapan unsur

hara yang dibutuhkan oleh tumbuhan untuk proses fotosintesis serta melindungi tumbuhan inang dari serangan penyakit, dan hasil dari fotosintesis dapat digunakan oleh fungi untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya.

2.1.2 Potensi Fungi Endofit

Beberapa potensi yang dimiliki oleh fungi endofit adalah sebagai berikut:

a. Meningkatkan pertumbuhan tanaman

Fungi endofit dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman secara langsung ataupun secara tidak langsung (Santoyo, 2016). Beberapa endofit telah terbukti membentuk mutualisme dengan tanaman, memberikan manfaat kebugaran seperti toleransi stres biotik dan abiotik, perolehan nutrisi dan peningkatan pertumbuhan dan hasil panen. (Redman *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2003; Mucciarelli *et al.*, 2003; Waller *et al.*, 2005; Schulz, 2006; Rodriguez *et al.*, 2008). Nassar *et al.* (2005) melaporkan endofit jagung dari kelompok khamir, *Williopsis saturnus* mampu menghasilkan hormon perangsang pertumbuhan tanaman, *indole-3-acetic acid* (IAA) dan *indole-3-pyruvic acid* (IPYA).

b. Meningkatkan ketahanan tanaman

Fungi endofit merangsang pertumbuhan tanaman dan meningkatkan ketahanan inang terhadap fungi pathogen (Perrig *et al.*, 2007). Sebagai contoh, keberadaan fungi *Neotyphodium coenophialum* pada sistem perakaran tanaman memicu pertumbuhan dan perkembangan akar ke dalam untuk memperoleh hara dan air sehingga tanaman mampu bertahan dalam kondisi kering dan cepat pulih jika mengalami stres air (Rodriguez *et al.*, 2009). Beberapa isolat fungi rhizosfer alang-alang yang diinokulasikan pada perakaran tanaman tomat yang telah dilaporkan dapat meningkatkan ketahanan tanaman tomat terhadap penyakit bercak coklat (*Alternaria solani*) pada daun tanaman tomat (Hersanti, 2002).

c. Menekan pertumbuhan organisme lain

Fungi endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit yang dapat berfungsi menekan pertumbuhan organisme antibiotika (antifungi/antibakteri) (Noverita, 2009; Li, JY. *et al.*, 2001; Horn WS., *et al.*, 1995), antimalaria (Calcul, 2013 dan Elfita, 2011), dan antiserangga (Azevedo *et al.*, 2000). Bahkan fungi endofit juga

dapat digunakan sebagai antivirus (Guo *et al.*, 2000; Zhang, 2011; Zhou, 2016) dan antioksidan (Strobel *et al.*, 2002).

d. Sebagai alternatif pengobatan herbal

Fungi endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit yang dapat berfungsi sebagai pengobatan herbal seperti antidiabetes (Dompeipen, 2015 dan Pujiyanto, 2015), antiimunopressif (Strobel and Daisy, 2003), dan antitumor/antikanker (Wu *et al.*, 2015 dan Chen *et al.*, 2016).

2.2 Karakter Makroskopis dan Mikroskopis Endofit Kesambi dan Ketapang

Fungi endofit berhasil diisolasi oleh Murdiah (2017) dari tanaman kesambi dan ketapang yang berasal dari Taman Nasional Baluran. Total isolat yang ditemukan adalah 2 isolat dari Kesambi (*Schleicera oleosa*) dan 1 isolat dari Ketapang (*Terminalia catappa*) yang selanjutnya disebut dengan KS₁, KS₂ dan KT₁. Isolat tersebut memiliki beberapa karakter makroskopis dan mikroskopis.

Karakter makroskopis yang dimiliki oleh endofit Kesambi 1 (KS₁) antara lain permukaan atas koloni berwarna putih keabu-abuan, permukaan bawah koloni berwarna putih bagian pinggir kekuningan, bentuk permukaan koloni tersebar, dan tekstur permukaan koloni seperti kapas. Sedangkan karakter mikroskopis KS₁ yakni ukuran hifanya paling besar, adanya sekat, hifa membentuk rhizoid, tidak ditemukan struktur reproduksi seksual, struktur reproduksi aseksualnya berupa sporangiospora, dan ukuran sporangiumnya kecil.

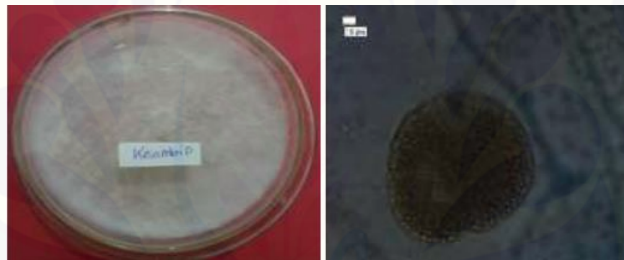
Karakter makroskopis yang dimiliki oleh endofit Kesambi 2 (KS₂) antara lain permukaan atas koloni berwarna putih, permukaan bawah koloni berwarna putih, bentuk permukaan koloni tersebar, dan tekstur permukaan koloni seperti kapas. Sedangkan karakter mikroskopis KS₂ yakni ukuran hifanya besar, adanya sekat, hifa membentuk rhizoid, tidak ditemukan struktur reproduksi seksual, struktur reproduksi aseksualnya berupa sporangiospora, dan ukuran sporangiumnya besar.

Karakter makroskopis yang dimiliki oleh endofit Ketapang (KT₁) antara lain permukaan atas koloni berwarna hitam, permukaan bawah koloni berwarna hitam, bentuk permukaan koloni tersebar, tekstur permukaan koloni seperti kapas

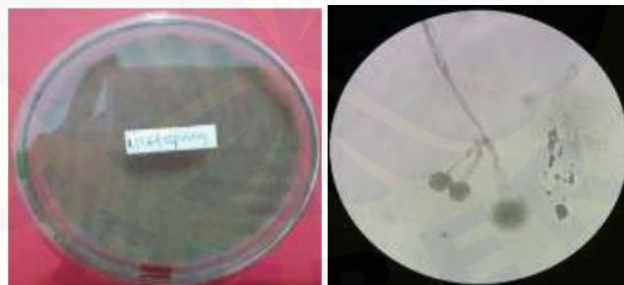
dan membentuk droplet di atas permukaan koloni. Sedangkan karakter mikroskopis KT_1 yakni ukuran hifanya paling kecil, adanya sekat, hifa tidak membentuk rhizoid, tidak ditemukan struktur reproduksi seksual, struktur reproduksi aseksualnya berupa sporangiospora, dan ukuran sporangiumnya kecil. Karakter makroskopis dan mikroskopis ketiga fungi endofit tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.1 berikut ini.



Fungi endofit Kesambi 1 (KS_1)



Fungi endofit Kesambi 2 (KS_2)



Fungi endofit Ketapang 1 (KT_1)

Gambar 2.1 Karakter makroskopis dan mikroskopis fungi endofit Kesambi dan Ketapang) $M=1000x$ (Sumber: Murdiyah, 2017).

2.3 Taksonomi Fungi Endofit

Secara umum, fungi mempunyai klasifikasi hirarki dari Kingdom, Filum, Kelas, Ordo, Famili, Genus dan Spesies (Alexopoulos, 2006). Kingdom terdiri

atas beberapa filum, dan beberapa filum tersebut terdiri atas beberapa kelas, beberapa ordo, beberapa genus, dan beberapa spesies. Setiap kategori kadang juga dipecah menjadi sub-filum, sub-kelas, serta varietas dan galur biologi dalam spesies. Standar nama akhir dari filum, kelas, ordo, dan famili dari fungi adalah –mycota, -mycete, -ales dan –aceae (Alexopoulos, 2006). Nama pada genus dan spesies tidak memiliki standar akhiran. Contoh dari hirarki ini adalah sebagai berikut:

Kingdom: Fungi

Devisi: **Ascomycota**

Class: **Pyrenomycetes**

Ordo: **Xylariales**

Famili: **Amphisphaeriaceae**

Taksonomi adalah cara untuk mengklasifikasikan nama organisme agar diterima di sistem internasional, berdasarkan hubungan antara organisme untuk meminimalisir ketidakjelasan sehingga lebih mudah untuk dikenal (Haeckel, 1894; Copeland 1956). Bagaimanapun, sistem klasifikasi setiap organisme selalu berubah, dan akan berlanjut berubah hingga celah dalam pengetahuan telah terpecahkan. Sebagai contoh klasifikasi fungi sebenarnya terjadi perbedaan pendapat dan interpretasi yang besar antar mikologis sendiri. Alexopoulos tahun 2006 menyatakan bahwa fungi diklasifikasikan ke dalam kingdom Plantae, namun bertentangan dengan Whittaker (1969) yang mana menyatakan bahwa sistem klasifikasi tiga kingdom diganti menjadi lima kingdom antara lain yakni Animalia, Plantae, Fungi, Protista, dan Monera. Klasifikasi tersebut lebih berdasarkan kepada karakteristik fenotip. Monera diidentifikasi sebagai prokariota karena tidak adanya membran inti dimana empat kingdom lainnya adalah multiseluler karena adanya membran inti dalam sel-selnya.

Strobell *et al.* (1996) mengemukakan bahwa fungi endofit meliputi genus *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Monochaetia*, dan lain-lain. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa fungi endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi

atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam fungi endofit (Radji, 2005).

Clay (1988) melaporkan bahwa fungi endofit dimasukkan dalam family Balansiae yang terdiri dari 5 genus yaitu *Atkinsonella*, *Balansiae*, *Balansiopsis*, *Epichloe*, dan *Myriogenospora*. Genus *Balansiae* umumnya dapat menginfeksi tumbuhan tahunan dan hidup secara simbiosis mutualistic dengan tumbuhan inangnya.

Fungi endofit yang diisolasi dari jaringan tanaman kebanyakan termasuk anggota Ascomycetes atau Deuteromycetes (fase aseksual) dan beberapa Basidiomycetes (Carroll, 1986). Beberapa Oomycetes pun juga terdapat endofit (Sinclair dan Cerkauskas, 1996). Beberapa anggota endofit Ascomycetes termasuk dalam kelas *Pyrenomycetes*, *Discomycetes* dan *Loculoascomycetes*. Selain dari tanaman inang, banyak juga endofit Ascomycetes adalah spesies dari *Cryptoline*, *Cryptosporiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Hypoxyton*, *Xylaria*, *Taxomyces*, *Monochaetia*, *Discostroma*, dan *Pestalotiopsis* (Bayman *et al.*, 1998; Carroll, 1988; Li *et al.*, 2000; Okane *et al.*, 1996; Strobel *et al.*, 1996).

2.4 Identifikasi Molekuler Fungi Endofit

Mengidentifikasi fungi dengan menentukan taksonominya biasanya didasarkan perbandingan morfologi yang paling menonjol (Lodge *et al.*, 1996; Sette *et al.*, 2006; Crous *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Menghubungkan persamaan morfologi endofit-endofit yang diidentifikasi harus diperhatikan karena karakteristik morfologi beberapa fungi bergantung medium dan kondisi kultur yang dapat mempengaruhi vegetatif dan kemampuan seksual (Zhang *et al.*, 2006; Hyde and Soyong, 2007).

Selanjutnya, metode konvensional sudah tidak dapat diterapkan untuk mengidentifikasi isolat fungi dikarenakan tidak terjadinya fase sporulasi dalam kultur, sehingga dikategorikan sebagai *mycelia sterilia* (Lacap *et al.*, 2003). Berbagai cara dengan mengubah kondisi pertumbuhan telah dilakukan agar terjadi tahap sporulasi, seperti media kultur yang berbeda, *Potato Dextrose Agar* (PDA),

Malt Extract Agar (MEA), *Corn Meal Agar* (CMA), *Potato Carrot Agar* (PCA), dan *Water Agar* (WA), serta dimasukkannya jaringan inang ke dalam kultur (Guo *et al.*, 2000). Namun demikian, sejumlah besar masih belum berhasil dalam kultur, kejadian *mycelia sterilia* ini sangat sering ditemukan pada penelitian endofit (Lacap *et al.*, 2003).

Sebaliknya, teknik molekuler menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mengidentifikasi mikroorganisme dan dapat digunakan untuk mengklasifikasikan strain mikroba pada tingkat taksonomi hierarki yang beragam (Sette *et al.*, 2006). Beberapa penelitian terbaru menunjukkan bahwa metode genetik ini berhasil digunakan dalam penelitian (Gao *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2007; Ligrone *et al.*, 2007; Sánchez Márquez *et al.*, 2007; Morakotkarn *et al.*, 2007). Sebagian besar fungi endofitik dideteksi dan diidentifikasi secara komparatif analisis urutan DNA ribosom, terutama wilayah ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Misalnya, Harney *et al.* (1997) mengidentifikasi fungi mikoriza arbuskula dari *Artemisia californica* menggunakan wilayah ITS. Guo *et al.* (2000) dan Lacap *et al.* (2003) mengevaluasi konsep morfotipe fungi endofit mengenai *mycelia sterilia* juga berdasarkan urutan DNA ribosom. Keanekaragaman fungi endofit yang tinggi terungkap dari *Heterosmilax japonica* atau *Livistona chinensis* menggunakan pendekatan *cultivation-independent* dengan menganalisis urutan DNA fungi yang diambil dari jaringan tanaman (Guo *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2005). Peintner *et al.* (2003) pertama mencatat ektomikoriza spesies *Cortinarius* dari India daerah tropis dan menetapkan posisi filogenetiknya menggunakan urutan ITS.

Isolasi DNA dan amplifikasi PCR pada daerah ITS rDNA merupakan tahap awal yang perlu dilakukan dalam identifikasi molekuler. Sekuens DNA pada daerah ITS rDNA berevolusi lebih cepat dibandingkan daerah gen lainnya sehingga akan bervariasi pada setiap spesies (White *et al.*, 1990). Hal ini akan mempermudah dalam identifikasi spesies dengan membandingkan tingkat kemiripan (homologi) sekuens DNA daerah ITS yang dimiliki suatu fungi dengan fungi lainnya.

2.5 Kerangka Konseptual

Fungi endofit kesambi dan ketapang telah diisolasi dan diperoleh tiga sampel yang berbeda yakni KS_1 , KS_2 dan KT_1 (Murdiyah, 2017). Kesambi 1 (KS_1), Kesambi 2 (KS_2), Ketapang 1 (KT_1) belum diketahui jenis spesiesnya sehingga diperlukan identifikasi ketiga sampel tersebut hingga tingkat spesies.

Teknik identifikasi dapat dilakukan secara konvensional namun hasil data yang didapat kurang akurat (Rahayu, 2015) selain itu kelemahan teknik ini dikarenakan sulitnya fungi melakukan tahap sporulasi seksual sehingga diperlukan teknik identifikasi lain (Lacap *et al.*, 2003).

Identifikasi yang akurat dan cepat adalah menggunakan teknik molekuler (Rinanda, 2011). Teknik molekuler menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mengidentifikasi mikroorganisme dan dapat digunakan untuk mengklasifikasikan strain mikroba pada tingkat taksonomi hierarki yang beragam (Sette *et al.*, 2006) karena sebagian besar fungi endofitik dideteksi dan diidentifikasi secara komparatif analisis urutan DNA ribosom.

Identifikasi KS_1 , KS_2 , dan KT_1 pada wilayah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dimana daerah ini berevolusi lebih cepat dibandingkan daerah gen lainnya (White *et al.*, 1990), hal ini akan mempermudah dalam membandingkan tingkat kemiripan (homologi) sekuens DNA daerah ITS yang dimiliki antar spesies KS_1 , KS_2 , dan KT_1 .

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian deskriptif yaitu identifikasi fungi endofit tanaman kesambi (*Schleichera oleosa*) dan tanaman ketapang (*Terminalia catappa*).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Maret sampai Oktober 2018, bertempat di dua laboratorium yaitu:

- a. Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember untuk peremajaan isolat fungi.
- b. Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember untuk ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, dan elektroforesis.

3.3 Variabel Penelitian

Sampel fungi endofit daun kesambi (*Schleichera oleosa*) dan ketapang (*Terminalia catappa*) yang digunakan adalah 3 sampel yaitu KS₁, KS₂, dan KT₁ yang akan dilihat karakteristik molekulernya masing-masing.

3.4 Definisi Operasional

Untuk menghindari kesalahan penafsiran dalam penelitian, maka perlu adanya definisi operasional. Adapun istilah yang perlu didefinisikan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a) Endofit adalah suatu organisme yang hidup di dalam tubuh tanaman. Beberapa organisme tersebut misalnya bakteri, fungi, tanaman, dan serangga tanaman (Schulz, 2006). Endofit yang digunakan dalam penelitian ini adalah fungi endofit yang sudah diisolasi (Murdiyah, 2017) yaitu 2 isolat fungi endosit kesambi (KS₁) dan (KS₂) dan ketapang (KT₁).

- b) Teknik identifikasi molekuler fungi adalah teknik analisis rDNA pada fungi yang memiliki daerah konservatif yaitu gen penyandi rDNA 18S, 5.8S dan 28S yang diantaranya terdapat daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Gomes *et al*, 2002). Tahapan identifikasi molekuler dimulai dari ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, elektroforesis kemudian sekuensing (Prihatini, 2014).
- c) DNA ribosomal (rDNA) adalah daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom (Mulyatni, 2011).
- d) ITS (*Internal Transcribed Spacer*) adalah daerah konservatif yang terdapat diantara gen penyandi rRNA 18S, 5.8S dan 28S (Gomes *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2005).
- e) PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara *in vitro* (Handoyo, 2000).
- f) Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik) (Pratiwi, 2001).
- g) Sekuensing adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA (Rogers, 2011).
- h) Pohon filogeni adalah sistem percabangan seperti diagram pohon yang merepresentasikan kelompok keturunan dari satu nenek moyang yang sama (Brinkman dan Leipe, 2001).

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu peralatan peremajaan fungi endofit antara lain tabung reaksi, cawan petri, timbangan, beaker glass, penangas air, tabung reaksi, autoclave, kapas, kertas kayu, incubator, pengaduk, *laminar air flow*, jarum ose, bunsen, mikropipet, tip, plastik wrap, dan rak tabung. Peralatan ekstraksi DNA antara lain mikropipet, tip, spatula, vortex, timbangan digital, spatula, botol schot, ependorf, tray ependorf, sentrifuge, *laminar air flow*, *shaker*, mortal pistil, dan incubator. Peralatan PCR antara lain glove dan masker steril, mikropipet, tip, pcr tube, sentrifuge, dan mesin PCR. Peralatan

elektroforesis antara lain seperangkat alat elektroforesis, elenmeyer, dan UV transluminator.

3.5.2 Bahan

Dalam penelitian ini, bahan yang digunakan adalah bahan untuk peremajaan fungi endofit antara lain *Potato Dextrose Agar*, Aquades, dan Kloramfenikol 1%, alkohol 70%, kapas, dan sampel fungi endofit KS₁, KS₂, KT. Bahan ekstraksi DNA antara lain Tris, NaCl, EDTA, SDS, Aquades steril, Proteinase K, Phenol Chlorofom Isoamil alcohol, etanol PA, naAc, etanol 70%, dan ddH₂O steril. Bahan kerja PCR antara lain ddH₂O steril, PCR *master mix*, primer ITS5 dan ITS4, dan template DNA. Bahan running elektroforesis antara lain gel agarose, aquades steril, buffer TAE, EtBr, DNA loading dye, dan 1 kb DNA Ladder.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Peremajaan fungi

Ketiga sampel fungi endofit yang digunakan yaitu KS₁, KS₂, dan KT₁ adalah koleksi di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Jember. Sampel diremajakan dengan media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan PDB (*Potato Dextrose Broth*). Inokulasi fungi endofit dilakukan dengan metode miring untuk KS₁ dan KS₂ sedangkan metode cair untuk sampel KT. Kemudian pada media PDA yang ditambah dengan kloramfenikol 1% dengan tujuan mencegah pertumbuhan bakteri. Isolat kemudian diinkubasi selama 2-4 hari pada suhu 27°-29°C (suhu ruang). Saat miselia pada kondisi tersebut dilanjutkan ke tahap ekstraksi DNA.

3.6.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA fungi endofit berdasarkan yang telah dilakukan oleh Rakhmana (2015). Miselia diambil sebanyak 50 mg kemudian digerus menggunakan mortal dan pistil dengan menambahkan buffer lysis yaitu Tris 100 Mm, NaCl 1 M, EDTA 10 mM, SDS 1% dan 45 µL proteinase K. Selanjutnya

divortex hingga homogen kemudian diinkubasi dengan suhu 55 °C semalaman. Setelah diinkubasi, disentrifuge 10000x selama 15 menit. Supernatan dipindah ke ependorf baru, kemudian ditambah PCI satu kali volume dan shake manual. Sentrifuge lagi selama 10 menit kemudian diambil supernatannya saja dan dipindahkan ke ependorf baru. Supernatant ditambahkan etanol PA sebanyak 0,8 dan naAC 0,2 dari volume supernatant kemudian ditaruh di suhu -20 °C semalaman selanjutnya disentrifuge lagi 10.000x selama 10 menit dan setelah itu etanol dibuang. Pelet DNA ditambahkan etanol 70% kemudian sentrifuge lagi 10.000x selama 10 menit dan setelah itu etanol dibuang dengan memperhatikan pellet jangan samapi terbang. Selanjutnya menginkubasi dalam suhu 37 °C hingga etanol benar-benar menghilang dan hanya tersisa pelletnya saja. Langkah terakhir menambahkan ddH₂O steril sejumlah 25 µL dan menyimpan dalam freezer suhu -20 °C sampai digunakan.

3.6.3 Amplifikasi PCR

Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berdasarkan yang telah dilakukan oleh Huang (2009) menggunakan mesin PCR Biometra TGradient . Amplifikasi daerah ITS rDNA sampel fungi endofit daerah ITS1 dan ITS2 dilakukan menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5 sesuai dengan peta posisi yang dirancang oleh White *et al.*, (1990). Amplifikasi dilakukan dalam campuran reaksi 50 µl yang masing-masing mengandung 25 µL, primer *forward* ITS5 10 µL, primer *reverse* ITS4 10 µL, ddH₂O 2 µL, dan DNA template fungi 3 µL. Siklus termal adalah sebagai berikut: *hot start* 5 menit pada suhu 95 °C, diikuti oleh *denaturation* 1,5 menit pada suhu 94 °C, *annealing* 1 menit pada suhu 45 °C, dan *extension* awal 3 menit pada suhu 72 °C, dan 8 menit pada suhu 72 °C untuk *final extension*.

3.6.4 Elektroforesis

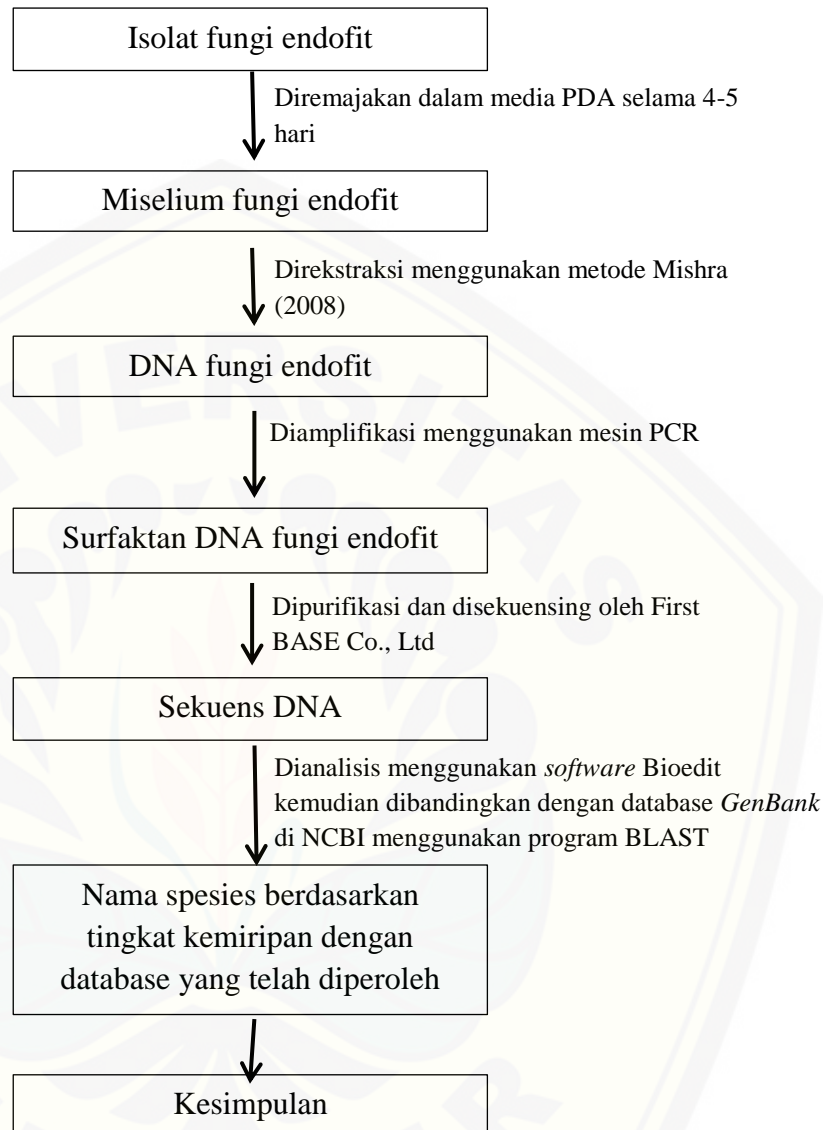
Elektroforesis berdasarkan yang telah dilakukan oleh Prihatini (2014). Produk hasil amplifikasi PCR di *running* elektroforesis pada gel agarose 1% pada

100 V selama 45 menit dengan marker DNA ladder 1 kb. Gel agarose kemudian divisualisasi pada UV transilluminator dan gambar diambil menggunakan kamera.

3.6.5 Purifikasi dan Sekuensing

Purifikasi mengikuti prosedur PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta kemudian dilanjutkan tahap sekuensing menggunakan dengan primer ITS4 dan ITS5 mengikuti prosedur First BASE, Singapura. Sekuens DNA yang diperoleh dibandingkan dengan database GenBank di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool Algorithm* (BLAST). Sekuens tersebut dicocokkan dengan sekuens yang paling dekat. Sekuens dianggap teridentifikasi tingkat spesies jika lebih dari 95% sesuai dengan sekuens database. Untuk melihat kesamaan sekuen antara ketiga sampel menggunakan *Multiple Sequences Aligment* program Clustal Omega di European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk) hingga membuat pohon filogeni sederhana.

3.8 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

Isolat KS₁ teridentifikasi sebagai spesies *Microascus gracilis*, sedangkan isolat KS₂ teridentifikasi sebagai spesies *Rhizopus microsporus*, dan isolat KT teridentifikasi sebagai spesies *Rhizomucor pusillus*. Hasil analisis filogenik menunjukkan bahwa ketiga fungi endofit tersebut memiliki kekerabatan yang jauh karena memiliki banyak perbedaan karakter-karakter genetik.

5.2 Saran

Adapun saran dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Perlu diadakan penelitian lanjutan untuk mengetahui kemampuan *Microascus gracilis*, *Rhizopus microsporus*, dan *Rhizomucor pusillus* yang dapat menguntungkan bagi kehidupan organisme lainnya khususnya kehidupan manusia.
- b. Perlu ketelatenan, kedisiplinan, keistiqomahan dalam mengerjakan penelitian molekuler dikarenakan pekerjaan molekuler adalah seni dalam sains dimana keberhasilannya ditentukan oleh faktor-faktor pada ridha Yang Maha Kuasa dan diri peneliti.
- c. Seharusnya jauh sebelum memulai penelitian dilakukan oprimasi terlebih dahulu agar ketika sudah memulai penelitian, peneliti fokus terhadap target yang akan dicari.

DAFTAR PUSTAKA

- Agatemor, C. 2006. Studies of selected physicochemical properties of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook F.) seed oil and tropical almond (*Terminalia catappia* L.) seed oil. *Pakistan Journal of Nutrition* 5(4): 306 – 307.
- Alexopoulos, C. J. 2006. *In Introductory Mycology*. New York: C. J. John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Al-Samarrai, T.H. and J. Schmid. 2000. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 53–56.
- Amir. 2007. *Dasar-dasar Penulisan Karya Ilmiah*. Surakarta: Universitas Sebelas Maret Press.
- Anuragi, Jay Lal and Mishra, RP. 2017. Ethnomedicinal study of *Schleichera oleosa* among the tribals of Satna. *International Journal of Applied Research* 3(3): 672-674.
- Arham, Washilul. 2015. Identifikasi Bakteri Simbion Nematoda Entomopatogen Isolat Lokal Asal Bromo Jawa Timur Berdasarkan Sekuen DNA Pengkode 16S rRNA. *Skripsi*. Jember: Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember.
- Arnold AE, Mejía LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. 2003. Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage In A Tropical Tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (100(26). December 23, 2003. *The National Academy of Sciences of the USA*: 15649–15654.
- Arnold, A. E. 2007. Understanding The Diversity of Foliar Endophytic Fungi: Progress, Challenges, and Frontiers. *Fungal Biology Reviews* 2: 51-66.
- Asy'ari, M., dan A. Noer, S. 2005. Optimasi Konsentrasi MgCl₂ dan Suhu Annealing Pada Proses Amplifikasi Multifragmens mtDNA dengan Metoda PCR. *J. Kim. Sains & Apl.* 8(1): 23-27.
- Azevedo, J.L. Macheroni, W. Pereira, J.O. and Araujo, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3(1), Issue of April 15.
- Bacon, C.W. and White, J.F.J. 2000. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. *In: Bacon CW, White JFJ, eds. Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker Inc., 237–263.
- Bayman, P., Angulo-Sandoval., P. and Baez-ortiz, Z. 1998. Distribution And Dispersal of Xylaria Endophytes in Two Tree Species in Puerto Rico. *Mycol. Res.* 102: 944-948.

- Blackshields, G., Wallace, I.M.M., Larkin and Higgins, D.G. 2006. Analysis and comparison of benchmarks for multiple sequence alignment. *Silico Biol.* 6: 321 – 339.
- Boyogueno, A.D.B. 2010. Characterization of Botryosphaeriaceae and Cryphonectriaceae associated with *Terminalia* spp. in Africa. *Tesis*. Pretoria: University of Pretoria.
- Brasileiro, T.R.V.B., Coimbra, M.R.M., Antonio de Moraes JrM, Tinti de Oliveria N. 2004. Genetic variability within *Fusarium solani* species as revealed by PCR fingerprinting based on PCR markers. *Braz J Microbiol.* 35: 205-210.
- Buchan, R and Newell. 2002. Analysis of *Internal Transcribed Spacer* (ITS) Region of rRNA Genes in Fungal Communities in Southeastern U.S. Salt Marsh. *Micro Ecol.* 43: 329-340
- Calcul, L., Waterman, C., Ma, W.S., Lebar, M.D., Harter, C., Mutka, T., Morton, L., Maignan, P., Olphen, A.V., Kyle, D.E., Vrijmoed, L., Pang, K.L., Pearce, C., and Baker, B.J. 2013. Screening Mangrove Endophytic Fungi for Antimalarial Natural Products. *Marine Drugs.* 11: 5036-5050
- Carroll G. 1988. Fungal Endophytes In Stems and Leaves – From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology.* 69: 2–9.
- Carroll, G. C. 1986. *The Hiology Of Endophytism In Plants With Partieular Referenee to Woody Perennials in Microbiology of the Phyllosphere* (ed. by N. Fokkema & J. Vanden Heuvel), pp . 205- 222. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Carroll, G. C. 1988. Fungal Endophytes In Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont. *Ecology.* 69: 2-9.
- Chen, L., Zhang, Q.Y., Jia, M. Ming, Q.L., Yue, W. Rahman, K., Qin, L.P., and Han T. 2016. Endophytic Fungi with Antitumor Activities: Their Occurrence and Anticancer Compounds. *Critical Reviews in Microbiology.* Volume 42: 454-473.
- Clay K. 1988. Fungal Endophytes of Grasses: A Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology.* 69: 10–16.
- Copeland, H. F. 1956. *Classification of the tower organisms*. California: Pacific Books.
- Crous, P.W., Braun, U., Schubert, K. and Groenewald, J.Z. 2007. Delimiting *Cladosporium* from Morphologically Similar Genera. *Studies in Mycology.* 58: 33-56.
- De Hoog GS, Guarro J, Gene J, 2011. *Atlas of Clinical Fungi CD-ROM version 3.1*. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

- Dharmayanti, I.N.L.P. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*. Volume 21 Nomor 1.
- Dolatabadi, S., Walther, G., Gerrits van den Ende, A. H. G. , and de Hoog, G. S. 2013. Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Diversity*. DOI 10.1007/s13225-013-0229-6.
- Dompeipen, E. J., Simanjuntak, P. 2015. Aktivitas Antidiabetes dan Antioksidan Kapang Endofit Dari Tanaman Mahoni (*Swietenia macrophylla* King).] *Biopropal Industri*. Volume 6 No.1.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. 2007. *Compendium of soil fungi ed 2*. Berlin: IHW Verlag.
- Edgar, R.C. and Batzoglou, S. 2006. Multiple sequence alignment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 368 – 373.
- Elfita, E., Muharni, M., Munawar., Legasari, L., Darwati. 2011. Antimalarial Compounds From Endophytic Fungi of Brotowali (*Tinaspora crispa* L). *Indonesian Journal of Chemistry*. Volume 11. No.1
- Gao, X.X., Zhou, H., Xu, D.Y., Yu, C.H., Chen, Y.Q. and Qu, L.H. 2005. High Diversity Of Endophytic Fungi From The Pharmaceutical Plant, *Heterosmilax japonica* Kunth Revealed by Cultivation-Independent Approach. *FEMS Microbiology Letters*. 249: 255-266.
- Ghosh, P., Chakraborty P., Mandal, A., Rasul, M.G., Chakraborty, M., Saha, A. 2011. Triterpenoids from *Schleichera oleosa* of Darjeeling foothills and their antimicrobial activity. *Indian J Pharm Sci*. 73: 231-233.
- Gomes E.A *et al.* 2002. Polymorphism in The Internal Transcribed Spacer (ITS) of The Ribosomal DNA of 26 Isolates of Ectomycorrhizal Fungi. *Genet Mol Biol*. 25(4): 477-483.
- Gomes E.A *et al.* 2002. Polymorphism in The Internal Transcribed Spacer (ITS) of The Ribosomal DNA of 26 Isolates of Ectomycorrhizal Fungi. *Genet Mol Biol*. 25(4), 477-483.
- Guo B., Dai J., Ng S., Huang Y., Leong C., Ong W., *et al.* . 2000. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. *Journal Natural Products*. 63: 602–604.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. 2000. Identification of Endophytic Fungi from *Livistona chinensis* Based On Morphology and rDNA Sequences. *New Phytologist*. 147: 617-630.
- Guo, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. 2001. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis*

- based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20: 1-13.
- Haeckel, E. 1894. Systematische Phylogenie der Protisten und Pflanzen. Entwurf eines natürlichen Systems der Organismen auf Grund ihrer Stammesgeschichte. [T. 1] Systematische Phylogenie der Protisten und Pflanzen. Germany: Sociedade Botânica do Brasil
- Handoyo, D., dan Rudiretna, A. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*. 9(1): 17-29.
- Haris, N., H. Aswidinoor, N.T. Mathius, A. Purwantara. 2003. Kemiripan Genetik Klon Karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) Berdasarkan Metode Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP). *Menara Perkebunan*. 71 (1): 1-15.
- Harney, S.K., Edwards, F.S. and Allen, M.F. 1997. Identification Of Arbuscular Mycorrhizal Fungi from *Artemisia californica* Using The Polymerase Chain Reaction. *Mycologia*. 89: 547-550.
- Hersanti. 2002. Pengujian kemampuan *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., dan *Penicillium* spp. dalam meningkatkan ketahanan tanaman tomat terhadap penyakit bercak coklat (*Alternaria solani* Sor.). *Jurnal Bionatura*. 4(3): 131-136.
- Horn, W. S., M. S. J. Simmonds, R. E. Schwartz, and W. M. Blaney. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron*. 14: 3969-3978.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Surveswaran, S., Hyde, K.D., Corke, H. and Sun M. 2009. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal diversity*. 36(6988.16):69-88 .
- Huson, D., and Nieselt. 2009. 3 Multiple Sequence Alignment. *Bioinformatics I*, WS'09-10: 19-59.
- Hyde, K.D. and Soyong, K. 2007. Understanding Microfungal Diversity-A Critique. *Cryptogamie Mycologie*. 28: 281-289.
- Irmawati. 2003. Perubahan keragaman genetic ikan kerapu tikus (*Cromileptes altivelis*) generasi pertama pada stok hatchery. *Tesis*. Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Iwen, P.C., Freifeld, A.G., Sigler, L., and Tarantolo, S.R. 2005. Molecular Identification of *Rhizomucor pusillus* as a Cause of Sinus-Orbital Zygomycosis in a Patient with Acute Myelogenous Leukemia. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(11): 5819-5821.

- Jennessen, J., Nielsen, K.F., Houbraeken, J., Lyhne, E.K., Schnurer, J., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. 2005. Secondary Metabolite and Mycotoxin Production by the *Rhizopus microsporus* Group. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1833–1840.
- KBBI. 2018. Kamus Besar Bahasa Indonesia (KBBI). <http://kbbi.web.id/>. [Diakses 1 Maret 2018]
- Kemena, C. and C. Notredame. 2009. Upcoming challenges for multiple sequence alignment methods in the highthroughput era. *Bioinformatics*. 25: 2455 – 2465.
- Kobayashi, M. M., Hiruma, M., Matsushita, A., Kawai, M., Ogawa, S., Udagawa, S. 2001. Cutaneous zygomycosis: a case report and review of Japanese reports. *Mycoses*. 44: 311-315.
- Lacap, D.C., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. 2003. An Evaluation Of The Fungal ‘morphotype’ Concept Based On Ribosomal DNA Sequences. *Fungal Diversity*. 12: 53-66.
- Lacap, D.C., Hyde, K.D. and Liew, E.C.Y. 2003. An Evaluation of The Fungal ‘morphotype’ Concept Based On Ribosomal DNA Sequences. *Fungal Diversity*. 12: 53-66.
- Li, J. Y., and G. A. Strobel. 2001. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycetocyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*. 57: 261-265.
- Li, J. Y., Strobel, G. A., Harper, I , Lobkovsky, E., and Clardy, J., 2000. Cryptocin, a Potent tetramic Acid Antimycotic from the Endophytic Fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Organic Letters*. 2(6): 767-770.
- Ligrone, R., Carafa, A., Lumini, E., Bianciotto, V., Bonfante, P. and Duckett, J.G. 2007. Glomeromycotean Associations in Liverworts: A Molecular Cellular and Taxonomic Analysis. *American Journal of Botany*. 94: 1756-1777.
- Lodge DJ, Fisher PJ, Sutton BC. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*. 88: 733–738.
- Maftuchah., Winaya. A., Zainudin. A., 2012. *Teknik Dasar Analisis Biologi Molekuler*. Yogyakarta: Deepublish Publisher.
- Mahaptma S.P, Sahoo, H.P. An ethano medico botanical study of Bolangi, Orissa, India: native plant remedies against gynaecological diseases. *Ethanobot Leaflet*. 12: 846-854.
- Matsushima, T. 1971. *Microfungi of the Solomon Islands and Papua New Guinea*. Published by the author, Kobe.

- Meshram N, Ojha M, Singh A, Alexander A, Sharma M. 2015. Significance and traditional medicinal properties of *Schleichera oleosa*. *Asian Journal of Pharmaceutical Research*. 5(1): 61-64.
- Morakotkarn, D., Kawasaki, H. and Seki, T. 2007. Molecular Diversity Of Bamboo-Associated Fungi Isolated from Japan. *FEMS Microbiology Letters*. 266: 10-19.
- Morton, F.J., Smith, G. 1963. The genera *Scopulariopsis bainier*, *Microascus zukai*, and *Doratomyces corda*. *Mycological Papers*. 86: 1–96.
- Mount, D.W. 2001. *Phylogenetic prediction*. In: *Bioinformatic, Sequence and Genome Analysis*. New York: Cold Spring Harbor laboratory. pp. 237–280.
- Mucciarelli M, Scannerini S, Berteza C, Maffei M. 2003. In Vitro and In Vivo Peppermint (*Mentha Piperita*) Growth Promotion by Nonmycorrhizal Fungal Colonization. *New Phytologist*. 158: 579–591.
- Mulyatni, A. S., Priyatmojo, A., Purwantara, A. 2011. Sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan jamur sekerabat pembeding. *Menara Perkebunan*. 79 (1): 1-5.
- Murdiyah, S. 2017. Fungi Endofit Pada Berbagai Tanaman Berkhasiat Obat Di Kawasan Hutan Evergreen Taman Nasional Baluran dan Potensi Pengembangan Sebagai Petunjuk Parktikum Mata Kuliah Mikologi. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*. Volume 3 (1).
- Nassar, A.H., El-Tarabily K.A. and K. Sivasithamparam. 2005. Promotion of Plant Growth by An Auxin-Producing Isolate of The Yeast *Williopsis saturnus* Endophytic In Maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol Fertil Soils*. 42: 97–108.
- Nei, M. 1987. *Molecular Genetics*. New York: Columbia University New York Press.
- Notredame, C. 2007. Recent evolutions of multiple sequence alignment algorithms. *PLOS Comput. Biol.* 3: E123.
- Noverita, Fitria, D., Sinaga, E. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4(4): 171 -176.
- Okane, I., Nakagiri, A., Ito, T. 1996. *Discostroma tricellular*, a new endophytic ascomycete with a *Seimatosporium* anamorph isolated from Rhododendron. *Canadian Journal of Botany*. 74(8): 1338-1344.
- Panda S.K. Ethno-medicinal uses and screening of plants for antibacterial activity from Similipal Biosphere Reserve, Odisha. *India. J Ethnopharmacol*. 151: 158-75.

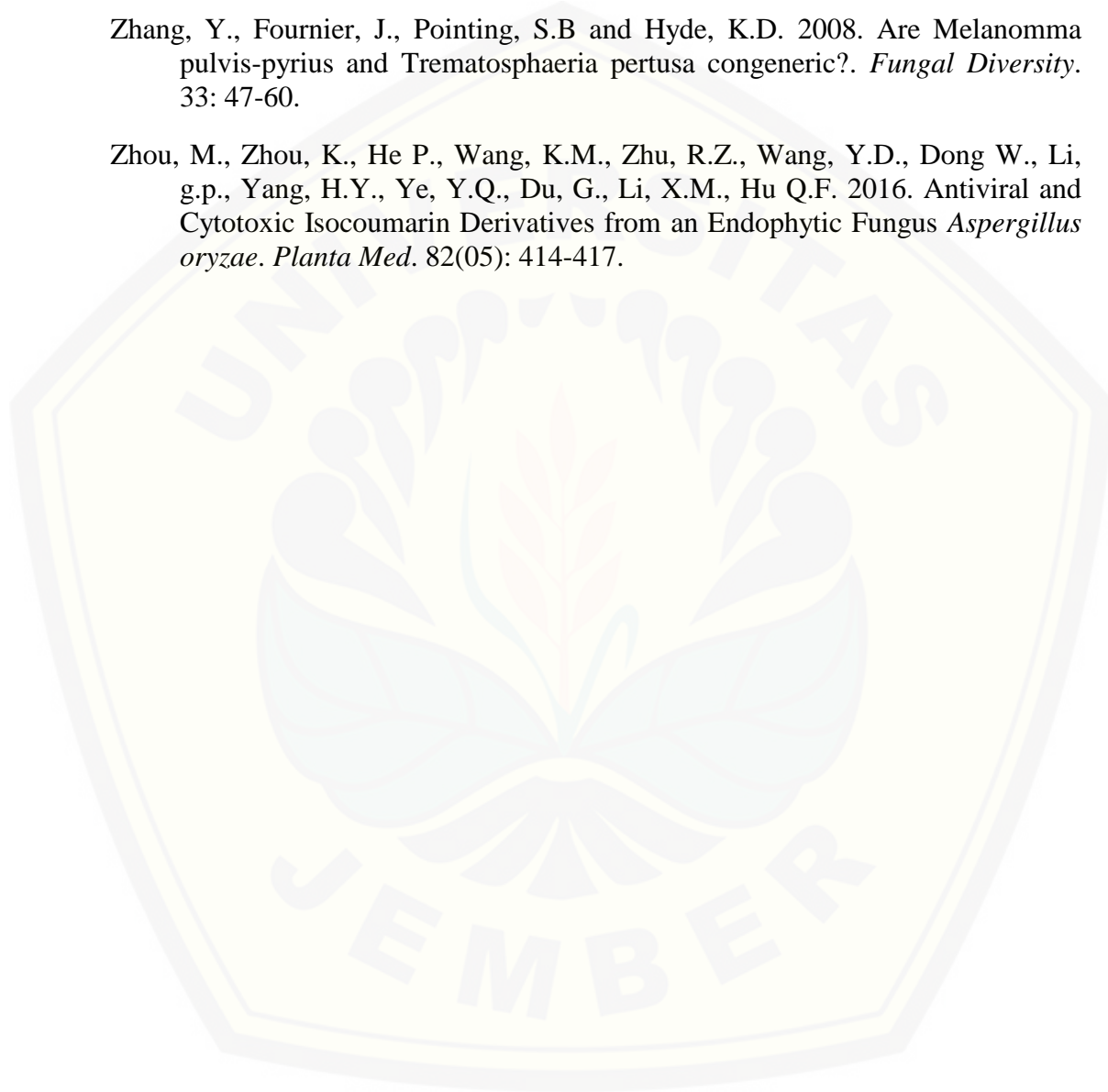
- Patra G.C, Sahu, P.S, Panda, P, Sahoo, S, Mohapatra, S, Bindhani, B.K. 2012. Anti-mycotic effect of 'kusum oil' extract on candida albicans clinical isolates from endophthalmitis cases. *Int J Pharm Bio Sci.* 3: B475-84.
- Pauly, G., 2001, Cosmetic, Dermatological and Pharmaceutical Use of An Extract of *Terminalia catappa*, *United State Patent Application* no. 200100022665: 1-2.
- Perrig, D., Boiero, M.L., Masciarelli, O.A., Penna, C., Ruiz, O.A., Cassan, F.D., Luna, M.V. 2007. Plant Growth Promoting Compounds Produced by Two Aromonomically Import Strains of *Azospirillum Brasilense*, and Implications for Inoculant Formulation. *Microbiology biotechnology.* 75: 1143-1150.
- Petrini, O., Sieber, T.N., Toti, L. and Viret, O. 1992. Ecology, Metabolite Production, and Substrate Utilization In Endophytic Fungi. *Nat Toxins.* 1: 185-196.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D. 1999. *Fungi and Food Spoilage, 2nd ed.* Chapman and Hall: Gaithersburg, MD.
- Pratama, M.A., Amin, M., Suarsini, E. 2016. Pengembangan Buku Ajar Matakuliah Bioteknologi Di Universitas Jember. *Jurnal Pendidikan.* 1(10): 1987-1992.
- Pratiwi, D., Suratno, Pujiastuti. 2014. Pengembangan Bahan Ajar Biologi Berbasis Pendekatan SAVI (*Somatic, Auditory, Visual, Intellectual*) XI SMA Dalam Meningkatkan Motivasi dan Hasil Belajar Siswa. *Jurnal Edukasi Unej.* I (2): 5-9
- Pratiwi, Rianta. 2001. Mengenal Metode Elektroforesis. *Oseana.* 26(1): 25 - 31
- Prihatini, Istiana. 2014. Identifikasi Jamur Endofit Daun Jarum *Pinus radiata* Menggunakan Metode Ekstraksi DNA Secara Langsung. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan.* 8(1): 30-42
- Prihatiningtias,W. 2005. Senyawa Bioaktif Fungi Endofit Tumbuhan Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) sebagai Agensia Antimikroba. *Tesis.* Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana UGM.
- Pujiyanto, S., Sunarno dan Widyasar, A. 2015. ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI ENDOFIT PENGHASIL INHIBITOR α -GLUKOSIDASE DARI TANAMAN PARE (*Momordica Charantia* L). *Prosiding SNST ke-6 Fakultas Teknik Universitas Wahid Hasyim.* A13: 65-71
- Purwani KI, Riskitavani DV. 2013. Studi potensi bioherbisida ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa*) terhadap gulma rumput teki (*Cyperus rotundus*). *Electr Jurnal Sains & Seni* 2(2). 1 p.

- Radji, M. 2005. Peranan Bioteknologi dan Mikroba Endofit Dalam Pengembangan Obat Herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. (2) 3: 113 – 126.
- Rahayu, F., Saryono, Nugroho, T.T. 2015. Isolasi DNA dan Amplifikasi PCR Daerah ITS rDNA Fungi Endofit Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*) LBKURCC69. *JOM FMIPA*. 2(1): 100-106
- Rakhmana, S., Saryono, Nugroho, T.T. Ekstraksi DNA dan Amplifikasi ITS rDNA Isolat Fungi Endofit LBKURCC67 Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*). *JOM FMIPA*. 2(1): 145-151.
- Rambe, E., Restuhadi, F., Nugroho, T.T. 2014. Amplifikasi DNA dan Sekuensing Daerah ITS-1 rDNA *Trichoderma* sp. LBKURCC22. *J. Ind.Che.Acta*. 4(2): 41-47.
- Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM. 2002. Thermotolerance Conferred To Plant Host And Fungal Endophyte During Mutualistic Symbiosis. *Science*. 298: 1581.
- Rinanda, Tristia. 2011. Analisis Sekuensing 16s rDNA Di Bidang Mikrobiologi. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*. 11(3): 172-177.
- Rodriguez R.J, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y, Redman R.S. 2008. Stress Tolerance In Plants Via Habitat-Adapted Symbiosis. *International Society of Microbial Ecology*. 2: 404–416.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J.F., Arnold, A. E. and Redman R. S.. 2009. Fungal Endophytes: Diversity and Functional Roles. *New Phytologist Rev*. 1-16.
- Rogers, K. 2011. *New Thinking about Genetics*. New York: Britannica Educational Publishing.
- Romli, A.S.M. 2012. *Jurnalistik Online: Panduan Mengelola Media Online*. Bandung: Nuansa Cendikia.
- Saikkonen K, Helander M, Faeth SH, Schulthess F, Wilson D. 1999. Endophyte-grass-herbivore interactions: the case of Neotyphodium endophytes in Arizona fescue populations. *Oecologia*. 121: 411– 420.
- Sánchez Márquez, S., Bills, G.F. and Zabalgoitia, I. 2007. The Endophytic Mycobiota of The Grass *Dactylis glomerata*. *Fungal Diversity*. 27: 171-195.
- Sandoval-Denis M, Sutton DA, Fothergill AW, Cano-Lira J, Gene J, Decock CA, de Hoog GS, Guarro J, 2013. Scopulariopsis, a poorly known opportunistic fungus: spectrum of species in clinical samples and in vitro responses to antifungal drugs. *Journal of Clinical Microbiology*. 51: 3937e3943.
- Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda Mdel C, Glick B.R. 2016. Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. *Microbiol Res*. 183: 92-99.

- Schipper, M.A.A., Stalpers, J.A. 1984. The *Rhizopus microsporus* group. *Stud Mycol.* 25: 20–34
- Schulz BJE. 2006. Mutualistic Interactions With Fungal Root Endophytes. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, eds. *Microbial root endophytes*. 261–280.
- Schulz BJE. 2006. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN, eds. *Microbial root endophytes*. pp 261–280.
- Sette, L.D., Passarini, M.R.Z., Delarmelina, C., Salati, F. and Duarte, M.C.T. 2006. Molecular Characterization and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi From Coffee Plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 22: 1185-1195.
- Sherwood M, Carroll G. 1974. Fungal Succession on Needles and Young Twigs of Old-Growth Douglas Fir. *Mycologia.* 66: 499–506.
- Silitonga, A.S., H.H. Masjuki, *et al.* 2015. *Schleichera oleosa* L oil as feedstock for biodiesel production. *Fuel* 156: 63–70.
- Sinclair, J. B. and Cerkauskas, R. F. 1996. *In Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants Systematics, Ecology, and Evolution*. Minnesota: APS Press
- Sinha, Animesh and Mandal. 2012. A. K. *Schleichera oleosa* – A Case for Transboundary Conservation. *IUFRO World Series*. Vol. 30.
- Situmeang, Boima; Nuraeni, Weny; Ibrahim, Agus Malik dan Silaban, Saronom. 2016. Analysis of secondary metabolite compounds from leaves extract kesambi (*Schleichera oleosa*) and antioxidant activity test. *Jurnal Pendidikan Kimia* 8(3): 13-18.
- Stone JK, Polishook JD, White JRJ. 2004. Endophytic fungi. In: Mueller G, Bills GF, Foster MS, eds. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. 241–270
- Strobel GA., and B. Daisy. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67(4): 491-502.
- Strobel, G. A., E. Ford, J. Worapong, J. K. Harper, A. M. Arif, D. M. Grant, P. C. W. Fung, and K. Chan. 2002. Ispoestacin, an Isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, Possessing Antifungal and Antioxidant Activities. *Phytochemistry.* 60: 179–183.
- Strobel, G., X. Yang, J. Sears, R. Kramer, R. S. Sidhu, and W. M. Hess. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an Endophytic Fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology.* 142: 435–440.

- Sukartini. 2008. Analisis Jarak Genetik dan Kekerabatan Aksesori-aksesori Pisang berdasarkan Primer Random Amplified Polymorphic DNA. *J. Hort.* 18(3): 261-266.
- Suparman. 2012. Markah Molekuler Dalam Identifikasi Dan Analisis Kekerabatan Tumbuhan Serta Implikasinya Bagi Mata Kuliah Genetika. *Jurnal Bioedukasi.* 1(1): 59-68.
- Tan, R.X. and Zou, W.X. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Natural Product Reports.*18: 448-459.
- Thomson, L.A.J. dan Evans, B. 2006. Terminalia catappa (Tropical almond). <http://www.traditionaltree.org> [24 Juli 2017].
- Varma, A., H. Padh, and N. Shrivastava. 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnol. J.* 2: 386-392.
- Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, von Wettstein D *et al.* 2005. The Endophytic Fungus *Piriformospora indica* Reprograms Barley to Salt-Stress Tolerance, Disease Resistance, and Higher Yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (102(38). September 20, 2005. *The National Academy of Sciences of the USA*: 13386–13391.
- Wang, Y., Guo, L.D. and Hyde, K.D. 2005. Taxonomic Placement Of Sterile Morphotypes Of Endophytic Fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in Northeast China based on rDNA Sequences. *Fungal Diversity.* 20: 235-260.
- Wati, S.I., Yuniastuti E., dan Nandariyah. 2014. Analisis Keragaman Pola Pita Dna Antar Varietas Ganyong (*Canna edulis* Ker.) Dari Daerah Karanganyar, Solo dan Boyolali Berdasarkan Penanda RAPD. *El-Vivo.* 2(1): 90 – 101.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.* New York, USA: Academic Press.
- Whittaker, R. H. 1969. New Concepts of Kingdoms of Organisms. *Science.* 163: 150-160.
- Wu, Y., Girmay, S., Martins da Silva, V., Perry, B., Hu, W., and Tan, G.T. 2015. The Role of Endophytic Fungi in the Anticancer Activity of *Morinda citrifolia* Linn. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* Volume 2015.
- Yang, Z., Rannala, B. 2012. Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature reviews genetics.* 13: 303-314.

- Zhang G, Sun S, Zhu T, Lin Z, Gu J, Li D, Gu Q. 2011. Antiviral Isoindolone Derivatives from An Endophytic Fungus *Emericella* Sp. Associated with *Aegiceras corniculatum*. *Phytochemistry*. 72(11-12): 1436-42.
- Zhang, H.W., Song, Y.C. and Tan, R.X. 2006. Biology and Chemistry of Endophytes. *Natural Product Reports*. 23: 753-771.
- Zhang, Y., Fournier, J., Pointing, S.B and Hyde, K.D. 2008. Are *Melanomma pulvis-pyrius* and *Trematosphaeria pertusa* congeneric?. *Fungal Diversity*. 33: 47-60.
- Zhou, M., Zhou, K., He P., Wang, K.M., Zhu, R.Z., Wang, Y.D., Dong W., Li, g.p., Yang, H.Y., Ye, Y.Q., Du, G., Li, X.M., Hu Q.F. 2016. Antiviral and Cytotoxic Isocoumarin Derivatives from an Endophytic Fungus *Aspergillus oryzae*. *Planta Med*. 82(05): 414-417.



LAMPIRAN

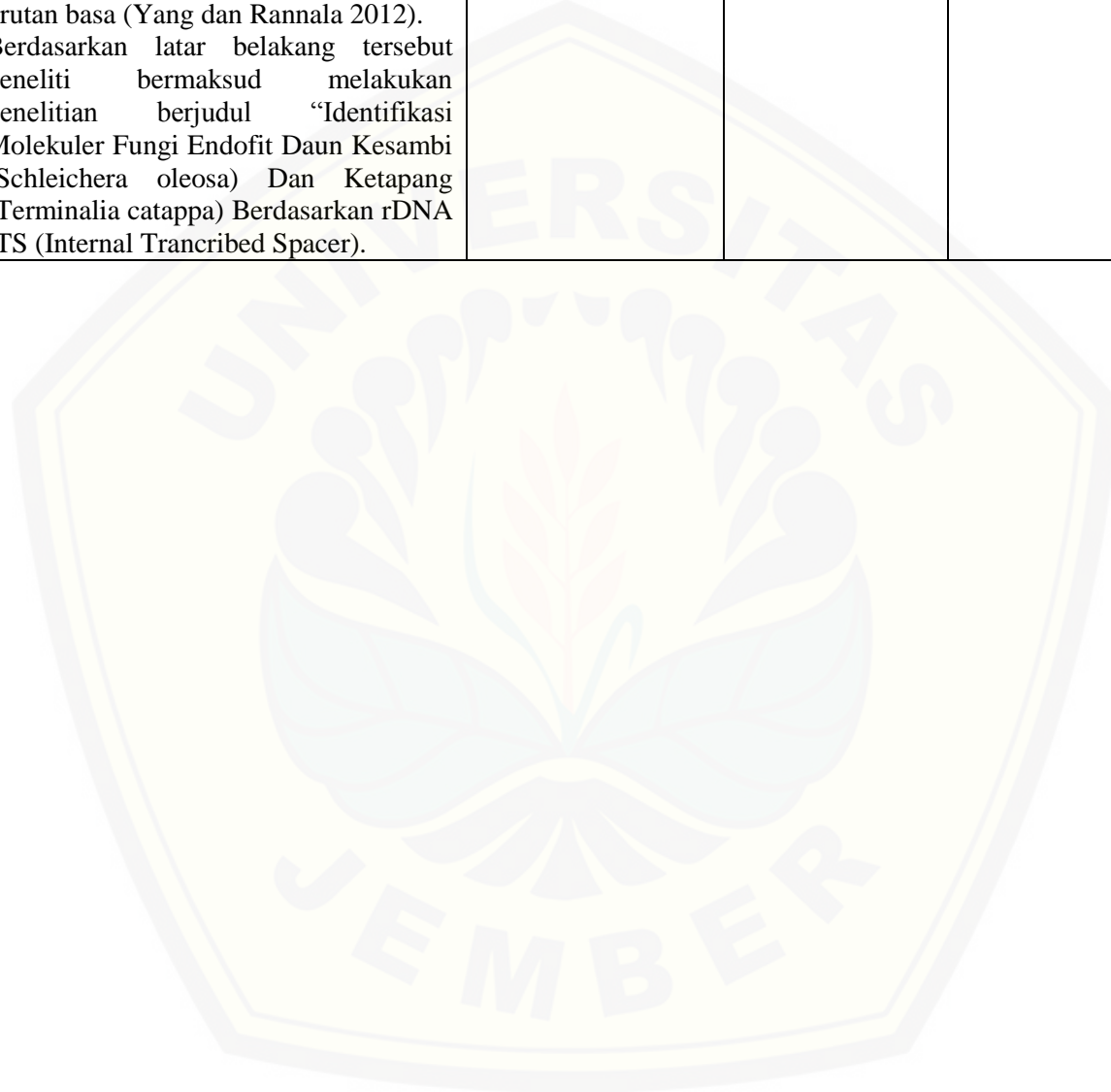
A. MATRIKS PENELITIAN

Judul	Latar Belakang	Rumusan Masalah	Variabel	Indikator	Sumber Data	Metode Penelitian
Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (Schleichera oleosa) Dan Ketapang (Terminalia catappa) Berdasarkan rDNA ITS (Internal Transcribed Spacer)	Kesambi dalam bidang farmakologis dapat digunakan sebagai antikanker, antioksidan dan antimikroba (Meshram, 2015). Beberapa organ dari kesambi telah digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit pada manusia seperti nyeri, penyakit kulit, borok, disentri, gigitan ular, dan melindungi dari malaria (Panda, 2014; Patra, 2012; Mahaptma dan Sahoo, 2008; dan Ghosh, 2011). Ketapang dalam bidang farmakologis mempunyai manfaat menyembuhkan nyeri sendi, disentri, sariawan, diuretik, kardiovaskuler, kulit, liver, pernafasan, gonorrhea, dan insomnia (Pauly, 2001; dan Thomson <i>et al.</i> , 2006). Beragam khasiat yang dimiliki kesambi dan ketapang disebabkan kandungan metabolit sekunder terutama pada bagian daunnya. Namun, perlu diketahui ekstraksi dan pemurnian zat metabolit aktif dari tanaman obat membutuhkan biomassa yang besar serta melalui	a. Bagaimana hasil identifikasi isolat fungi endofit daun kesambi dan ketapang menggunakan analisis rDNA ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)? b. Apakah buku petunjuk praktikum tentang identifikasi isolat fungi endofit daun kesambi dan ketapang menggunakan analisis rDNA ITS (<i>Internal</i>	a. Variabel: Analisis rDNA ITS isolat fungi endofit daun kesambi dan ketapang.	Data sekuens berupa <i>text file</i> hasil tahap <i>sequencing</i> dan data hasil analisis BLAST pada <i>database genebank NCBI</i> .	a. Data primer: Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan terhadap identifikasi isolat fungi endofit daun kesambi dan ketapang menggunakan analisis rDNA ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>). b. Data sekunder: Didapatkan dari internet,	a. Model penelitian adalah penelitian eksperimental laboratorium b. Meremajakan isolate kapang endofit daun kesambi dan ketapang untuk preparasi sampel. c. Membuat isolasi DNA. d. Melakukan pengenceran DNA e. Melakukan amplifikasi PCR dan elektroforesis pada gel

	<p>pengambilan sampel yang destruktif (Murdiyah, 2017). Sehingga dibutuhkan alternatif lain untuk mengambil khasiat pada kedua tanaman obat tersebut tanpa harus merusak tatanan ekologis mereka di alam (Murdiyah, 2017).</p> <p>Fungi endofit dianggap sebagai sumber metabolisme sekunder baru yang menawarkan alternatif eksploitasi potensi medis, pertanian, dan industri secara langsung pada metabolit sekunder pada tanaman (Strobel <i>et al.</i>, 2003). Fungi endofit umumnya memproduksi metabolit sekunder yang memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat seperti misalnya senyawa-senyawa anti kanker, anti virus, atau anti bakteri (Noverita, 2009) dan metabolit sekunder yang dihasilkan memiliki aktivitas yang lebih besar dibandingkan aktivitas senyawa dari tumbuhan inangnya (Prihatiningtias, 2005).</p> <p>Isolasi fungi endofit dari daun kesambi dan ketapang telah berhasil dilakukan (Murdiyah, 2017) yaitu isolat fungi endofit kesambi (KS₁ dan KS₂) berjumlah dua spesies dan satu spesies fungi endofit ketapang (KT₁) yang semuanya belum teridentifikasi jenis spesiesnya. Sehingga diperlukan identifikasi terhadap isolat fungi endofit</p>	<p><i>Transcribed Spacer</i>) menghasilkan buku yang layak?</p>			<p>jurnal dan buku sebagai pendukung informasi yang dibutuhkan.</p>	<p>agarose 1%. f. Melakukan DNA <i>sequencing</i> dan analisis data.</p>
--	---	---	--	--	---	--

	<p>dari daun kesambi dan ketapang. Identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis memiliki kelemahan karena kurang akuratnya hasil data sehingga diperlukan identifikasi metode lainnya yang lebih teliti dalam mengidentifikasi identitas organisme, yaitu metode identifikasi molekuler (Rahayu, 2015).</p> <p>Identifikasi molekuler dapat dilakukan menggunakan daerah ITS (<i>Internal Transcribed Spacer</i>) ribosomal DNA (rDNA). Sekuen rDNA region ITS memiliki variasi sekuen relatif tinggi pada gen rDNA tiap spesies, sehingga sangat baik digunakan untuk identifikasi tingkat genus hingga spesies (Buchan <i>et al.</i>, 2002).</p> <p>Salah satu hasil yang diperoleh dari mengidentifikasi secara molekuler adalah sekuens DNA yang selain dapat dianalisis hingga dapat diketahui tingkatan taksonnya, namun juga mengetahui pendekatan filogenetiknya (Suparman, 2012). Filogenetik molekuler merupakan suatu metode yang sering digunakan hampir disemua cabang biologi untuk perbandingan genom dan untuk mengetahui hubungan antar spesies berdasarkan pohon kehidupan melalui perhitungan statistika</p>					
--	--	--	--	--	--	--

	<p>urutan basa (Yang dan Rannala 2012). Berdasarkan latar belakang tersebut peneliti bermaksud melakukan penelitian berjudul “Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (<i>Schleichera oleosa</i>) Dan Ketapang (<i>Terminalia catappa</i>) Berdasarkan rDNA ITS (Internal Transcribed Spacer).</p>					
--	--	--	--	--	--	--



B. SURAT IJIN PENELITIAN

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
Jalan Kalimantan Nomor 37 Kampus Bina Tegalboto Jember 68121
Telepon: 0331-334988, 330738 Fax: 0331-332475
Laman: www.fkip.unj.ac.id

12 Mei 2018

Nomor: 2139 /UN25.1.BLT/2018
Lampiran: -
Perihal: Permohonan Ijin Penelitian

Yth. Dekan Fakultas MIPA
Universitas Jember
Jember

Dibertabakan dengan hormat, bahwa mahasiswa FKIP Universitas Jember di bawah ini:

Nama : Mylia Mustahid
NIM : 140210023060
Jurusan : Pendidikan MIPA
Program Studi : Pendidikan Biologi

Berkaitan dengan penyelesaian studinya, mahasiswa tersebut bermaksud melaksanakan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember dengan judul "Identifikasi Molekuler Fungsi Endosit Dan Kanamibi (Schleicheria oleosa) Dan Ketapang (*Terminalia catappa*) Serta Pemanfaatannya Sebagai Bakteri Pemisah Pupuk".

Sehubungan dengan hal tersebut, mohon Saudara berkenan memberikan izin dan sekaligus memberikan bantuan informasi yang diperlukan.

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya yang baik kami sampaikan terimakasih.


Dekan
Dekan I
Susanto, M.Pd.
06706251992031003

Terselamat
1. Ketua Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember
2. Arsip

 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEGURUAN DAN ILMU PENDIDIKAN
Jalan Kalimantan Nomor 37 Kampus Bumi Tegalboto Jember 68121
Telepon: 0331-334988, 3307387 Fax: 0331-332474
Laman: www.dkip.unsi.ac.id

Nomor 2139 / UN21.L.HLT/2018 12 MAR 2018
Lampiran (Perubahan Iain Penelitian)
Penbal

Yth. Dekan Fakultas MIPA
Universitas Jember
Jember

Diberitahukan dengan hormat, bahwa mahasiswa TKIP Universitas Jember di bawah ini:

Nama : Melin Marwan
NIM : 140210103090
Jurusan : Pendidikan MIPA
Program Studi : Pendidikan Biologi

Berkomunikasi dengan penyelesaian masalah, mahasiswa tersebut berakad melakukan penelitian di Laboratorium Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember dengan judul "Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kacambah (*Schleichera oleosa*) Dari Kerampang (Jember) sebagai *Trichoderma* Sebagai Buku Ilmiah Populer".

Sehubungan dengan hal tersebut, mohon Saudara berkenan memberikan izin dan sekaligus memberikan bantuan informasi yang diperlukan.

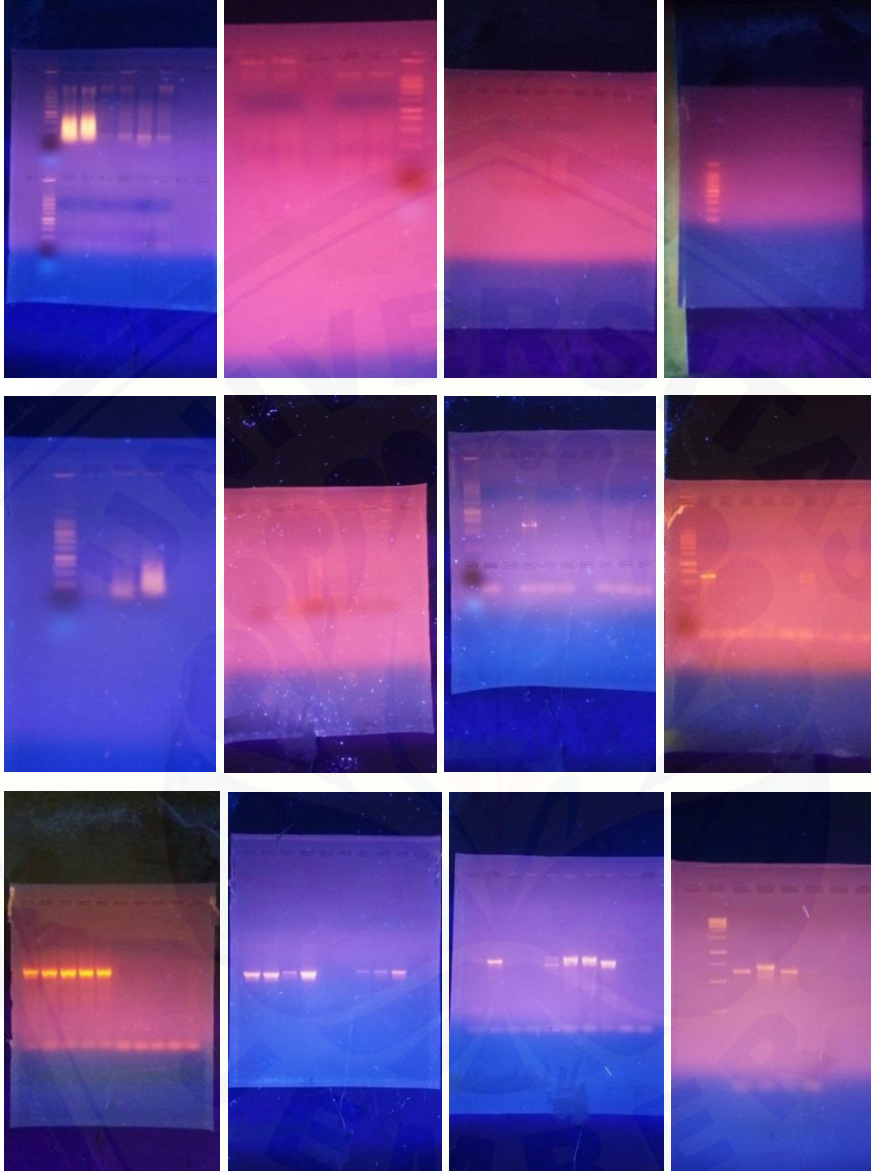
Demikian atas perhatian dan kerjasamanya yang baik kami sampaikan terimakasih.


Sachito, M.Si
No. 196706251997031001

Tembusan Yth:

1. Ketua Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember
2. Arsip

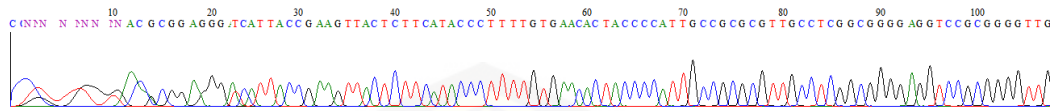
C. HASIL ELEKTROFORESIS



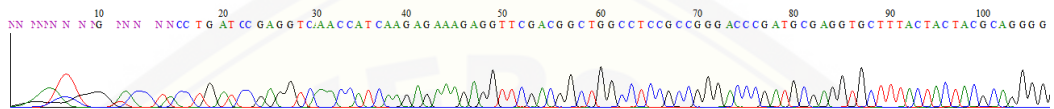
D. HASIL SEKUENSING

Sampel KS₁

Forward



Reverse



Forward

TTACCGAAGTTACTCTTCATACCCTTTTGTGAACACTACCCCATGCCGCGCGTTGCCT
CGGCGGGGAGGTCCGCGGGGTTGCGCTCCGGCGCTCCCCCGGGCCCCGCCGGCCG
CGCCGAACTCTTCATTTGCAAAGCGGACTGTATGTTCTGATTATATCTTGAAAAACAA
GTCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA
TTGCGCCCCGGCAGCAATCTGCCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCGAG
CGCGTTTCGGCCCCTAGCGGGCCGTCCGCGCCCGGTGTTGGGGCGCTGCGGGCCCTC
GTGCCCGCAGGCCCTGAAATGAAGTGGCGGTCCCGCCGCGGCGCCCCCTGCGTAGTA
GTAAAGCACCTCGCATCGGGTCCCGCGGAGGCCAGCCGTCGAACCTCTTTCTCTTGA
TGGTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGTTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG

Reverse

ATCCGAGGTCAAACCATCAAGAGAAAGAGGTTTCGACGGCTGGCCTCCGCCGGGACCC
GATGCGAGGTGCTTTACTACTACGCAGGGGGCGCCGCGGGACCGCCACTTCATTT
CAGGGCCTGCGGGCAGGAGGGCCCGCAGCGCCCAACACCGGGCGGGGACGGCCC
GCTAGGGGCCGAACCGCGCTCGAGGGCAGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGGC
AGATTGCTGCCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAA
TTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCG
TTGTTGAAAGTTTTGACTTGTTTTTCAAGATATAATCAGAACATACAGTCCGCTTTGCA
AATGAAGAGTTTCGGCGCGGCCGGCGGGGGCCCGGGGGAGCGCCGGAGCGCAACCC
CGCGGACCTCCCCCGGAGGCAACGCGCGGCAATGGGGTAGTGTTACAAAAGGGTA
TGAAGAGTAACTTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTACG
AC

Sequences producing significant alignments:

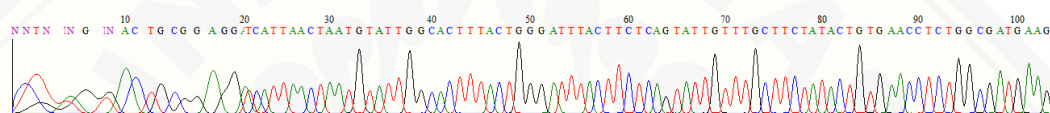
Select: All None Selected 0

Alignments [Download] [GpRank] [Graphics] [Distance tree of results]

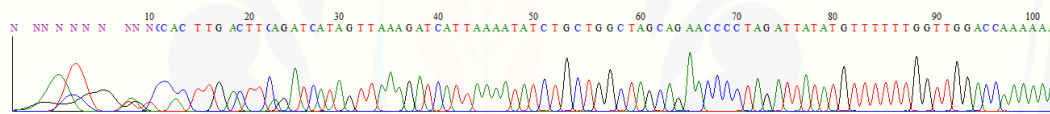
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Microascus gracilis genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain BMU04786	1144	1144	100%	0.0	100%	LN850768.1
<input type="checkbox"/> Microascus gracilis genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain BMU02787	1144	1144	100%	0.0	100%	LN850767.1
<input type="checkbox"/> Scopulariopsis gracilis strain FMR 12224 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2451 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1144	1144	100%	0.0	100%	KP132760.1
<input type="checkbox"/> Scopulariopsis gracilis strain FMR 12231 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2452 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1138	1138	100%	0.0	99%	KP132761.1
<input type="checkbox"/> Uncultured fungus clone CMH003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spa	1138	1138	100%	0.0	99%	KF800094.1
<input type="checkbox"/> Microascus cinereus genomic DNA sequence contains 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain CBS 116059	1136	1136	100%	0.0	99%	LN850766.1
<input type="checkbox"/> Scopulariopsis gracilis strain FMR 12205 isolate ISHAM-ITS_ID MITS2450 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal	1136	1136	100%	0.0	99%	KP132759.1
<input type="checkbox"/> Microascus gracilis strain CBS 369.70 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tr	1131	1131	100%	0.0	99%	MH971468.1
<input type="checkbox"/> Microascus gracilis strain CBS 369.70 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tr	1131	1131	100%	0.0	99%	MH859716.1
<input type="checkbox"/> Microascus cinereus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain MUCL 9049 = CBS 300.61	1118	1118	99%	0.0	99%	LM652417.1
<input type="checkbox"/> Microascus cirrosus strain ATCC MYA-4885 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcr	1116	1116	97%	0.0	100%	JQ908771.1

Sampel KS₂

Forward



Reverse



Forward

GAGGATCATTAACTAATGTATTGGCACTTTACTGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGC
 TTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGAAGGTCGTAACCTGACCTTCGGGAGAGACTCAG
 GACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCTGTTCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGAT
 TACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGAAGGTGCCTGGTACCCTTTACCATATACCATGAATTC
 AGAATTGAAAGTATAATATAATAACAACCTTTTAACAATGGATCTCTTGTTCTCGCAT
 CGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCGTGAATCAT
 CGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTCTATAGAGTACGCTTGCTTCAGT
 ATCATAACCAACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGGTGATGGACAAGCTCGGTAA
 ATTTAATTATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATTTTCATTAAATTAC
 GAACTACCTAGCCATCGTGCTTTTTTGGTCCAACCAAAAAACATATAATCTAGGGGTT
 CTGCTAGCCAGCAGATATTTTAATGATCTTTAACTATGATCTGAAGTCAAGTGGGACT
 ACCCGCTGAACTTAAGCATATC

Reverse

ATCATAGTTAAAGATCATTAAAATATCTGCTGGCTAGCAGAACCCTAGATTATATGT
 TTTTTGGTTGGACCAAAAAAGCACGATGGCTAGGTAGTTCGTAATTTAATGAAAATTA
 CAAAGAGGCTGTATTTTAGACAATCGGTATAATAATTAATTTAACCGAGCTTGTTCCA
 TCACCACATAAAATAAATTTTATGTGTGGGTTGGTTATGATACTGAAGCAAGCGTACT
 CTATAGAAGATCCATAGAGTGCAAGCTGCGTTCAAAGACTCGATGATTCACGAATAT
 GCAATTCACACTAGTTATCGCACTTTGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAACCAAGAG
 ATCCATTGTTAAAAGTTGTTATTATATTATACTTTCAATTTCTGAATTCATGGTATATGG
 TAAAGGGTACCAGGCACCTTCTTCCCAAAGGAAGAAAGGTAATCCTGATTGGCATC
 GATCAAACCCAGAACAGGCCTACCCATTATAGCCTATATGTCTGAGTCTCTCCCGA

AGGTCAGTTACGACCTTCATCGCCAGAGGTTACAGTATAGAAGCAAACAATACTGA
 GAAGTAAATCCCAGTAAAGTGCCAATACATTAGTTAATGATCCTTCCGCAGGTTACACC
 TACGGAAACCTTGTTA

Sequences producing significant alignments:

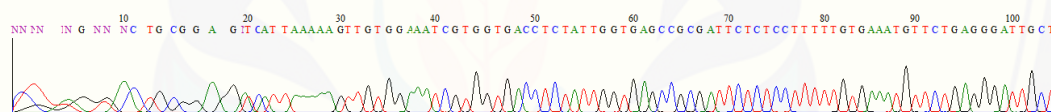
Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus strain CBS 130158 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal	1273	1273	100%	0.0	99%	MH85595.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus var. rhizopodiformis strain CBS 536.80 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA	1273	1273	100%	0.0	99%	MH861294.1
<input type="checkbox"/> Uncultured fungus clone CMH146 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spac	1273	1273	100%	0.0	99%	KF800237.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: ATH40	1273	1273	100%	0.0	99%	AB894625.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: ATH29	1273	1273	100%	0.0	99%	AB894624.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus var. chinensis strain CBS 631.82 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1271	1271	99%	0.0	99%	MH861534.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus var. chinensis strain CBS 289.71 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1271	1271	99%	0.0	99%	MH860128.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus var. chinensis strain CBS 346.49 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	1271	1271	99%	0.0	99%	MH856547.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate ATH54 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed sr	1269	1269	100%	0.0	99%	KF709979.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: ATH63	1269	1269	100%	0.0	99%	AB894627.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus strain IHFM 21967 isolate ISHAM-ITS_ID.MITS2194 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal r	1267	1267	100%	0.0	99%	KP132670.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate ATH59 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed sr	1267	1267	99%	0.0	99%	KF709988.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus var. oligosporus strain ATCC 22959 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA g	1262	1262	99%	0.0	99%	KU729104.1
<input type="checkbox"/> Rhizopus microsporus isolate F17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; a	1258	1258	98%	0.0	99%	EF151442.1

Sampel KT

Forward



Reverse



Forward

TAAAAAGTTGTGGAAATCGTGGTGACCTCTATTGGTGAGCCGCGATTCTCTCCTTTTGG
 TGAAATGTTCTGAGGGATTGCTCCAGATCTCTCGACCTTTTATTTTACATATTTGATTG
 ACTGTTGTTTAAACAATTGAAAGTTTTGGATCAGAAATGATTCAAGACGATAAAATTT
 CAAAACAACCTTTAAGCAATGGATCACTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGTAGCAA
 ATTGCGAAAAGTAATGCGATCTGCAGCCTTTGCGAATCATCGAATTCTCGAACGCACC
 TTGCACCCTTTGGTTCATCCATTGGGTACGTCTAGTTCAGTATCTTTATTAACCCCTAA
 AGGTTTATTTTTTGGATAAATCTTTGGATTTGCGGTGCTGATGGATTTTCATCCGTTCAA
 GCTACCCGAACAATTTGTATGTTGTTGACCCTTGATATTTCCCTTGAGGGTTTGCATTGG
 TATCTAATTTTTTACCAGTGTGCTTCGAGATGATCAAGTATAAAGGTCAATCAACCAC
 AAATAAATTTCAACTATGGATCTGAACTTAGATGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCAT
 ATCAA

Reverse

ATCCATAGTTGAATTTATTTGTGGTTGATTGACCTTTATACTTGATCATCTCGAAGCAC
 ACTGGTAAAAAATTAGATACCAATGCAACCCTCAAGGAAATATCAAGGGTCAACAA
 CATACAAATTTGTTCCGGTAGCTTGAACGGATGAAAATCCATCAGCACCCGAAATCCA

AAGATTTATCAAAAATAAACCTTTAGGGGTTAATAAAGATACTGAACTAGACGTAC
 CCAATGGATGAACCAAGGGTGCAAGGTGCGTTCGAGAATTCGATGATTCGCAAAGG
 CTGCAGATCGCATTACTTTTCGCAATTTGCTACGCTCTTCATCGATGCGAGAACCAAG
 TGATCCATTGCTTAAAGTTGTTTTGAAATTTTATCGTCTTGAATCATTCTGATCCAAA
 ACTTTCAATTTGTTAAACAACAGTCAATCAAATATGTAAAATAAAAGGTTCGAGAGATC
 TGGAGCAATCCCTCAGAACATTTACAAAAAGGAGAGAATCGCGGCTCACCAATAGA
 GGTACCACGATTTCCACAACTTTTTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAAC
 CTTGTTACG

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus strain HT-M27-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1157	1157	100%	0.0	99%	KJ527032.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus genes for small subunit rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and large subunit rRNA, partial and complete sequence, strain: IFM 46300	1157	1157	100%	0.0	99%	AB369914.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus strain HS-A5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1142	1142	98%	0.0	100%	HQ404243.1
<input type="checkbox"/> Uncultured Rhizomucor clone LZ02-13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1140	1140	98%	0.0	100%	KF984348.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus strain HN05 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1138	1138	97%	0.0	100%	JQ796883.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus isolate AK2 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1136	1136	98%	0.0	99%	KY583064.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor lauricus strain KUIea04-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1136	1136	97%	0.0	100%	KJ948643.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus strain SC-A2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1136	1136	98%	0.0	99%	HQ404247.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus strain PC-A1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1136	1136	98%	0.0	99%	HQ404245.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus strain KS-B1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1136	1136	98%	0.0	99%	HQ285721.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus strain AD-C1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1136	1136	98%	0.0	99%	HQ285701.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor miehei 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1134	1134	100%	0.0	99%	KJ0672655.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus isolate F18 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1134	1134	98%	0.0	99%	EF151443.1
<input type="checkbox"/> Rhizomucor pusillus strain CNRMA 04.210 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, strain: IFM 46300	1134	1134	98%	0.0	99%	DQ118999.1

E. DOKUMENTASI PENELITIAN

Alat dan Bahan



Peremajaan Fungi Endofit



Ekstraksi DNA



Amplifikasi PCR



Elektroforesis

