

**IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI BUAH DAN BIJI JUWET
(*Syzygium cumini* L.) Skeels BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI
DAN ANALISIS rDNA ITS (*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER*)**

SKRIPSI

Oleh :

NADA ASMARA HANIN

NIM. 14620022



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI BUAH DAN BIJI JUWET
(*Syzygium cumini* L.) Skeels BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI
DAN ANALISIS rDNA ITS (*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER*)**

SKRIPSI

Oleh :

NADA ASMARA HANIN

NIM. 14620022



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI BUAH DAN BIJI JUWET
(*Syzygium cumini* L.) Skeels BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI
DAN ANALISIS rDNA ITS (*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER*)**

SKRIPSI

Diajukan Kepada:
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Oleh :
NADA ASMARA HANIN
NIM. 14620022

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI (UIN)
MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2018**

**IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI BUAH DAN BIJI JUWET
(*Syzygium cumini* L.) Skeels BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI
DAN ANALISIS rDNA ITS (*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER*)**

SKRIPSI

Oleh :
NADA ASMARA HANIN
NIM. 14620022

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal: ... Juli 2018

Dosen Pembimbing I

Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc.

NIDT. 19900428 20160801 2 062

Dosen Pembimbing II

Mujahidin Ahmad, M.Sc.

NIDT. 19860512 20160801 1 060

Tanggal, 21 Juni 2018

Mengetahui
Ketua Jurusan Biologi

Romaidi, M. Si.,D. Sc

NIP. 19810201 200901 1 019



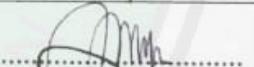
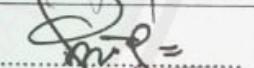
**IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI BUAH DAN BIJI JUWET
(*Syzygium cumini* L.) Skeels BERDASARKAN KARAKTER MORFOLOGI
DAN ANALISIS rDNA ITS (*INTERNAL TRANSCRIBED SPACER*)**

SKRIPSI

Oleh:
NADA ASMARA HANIN
NIM. 14620022

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Pengaji Skripsi dan
Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Tanggal:

Pengaji Utama	<u>Dr. Hj. Ulfa Utami, M. Si</u> <u>NIP. 1965050919990320002</u>	
Ketua Pengaji	<u>Nur Kusmiyati, M.Si</u> <u>NIDT. 19890816 20160801 2 061</u>	
Sekretaris Pengaji	<u>Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc.</u> <u>NIDT. 19900428 20160801 2 062</u>	
Anggota Pengaji	<u>Mujahidin Ahmad, M.Sc.</u> <u>NIDT. 19860512 20160801 1 060</u>	

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nada Asmara Hanin

NIM : 14620022

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Identifikasi Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi Dan Analisis rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 21 Juni 2018

Yang membuat pernyataan,



Nada Asmara Hanin
NIM. 14620022

MOTTO

إِنَّ أَحْسَنَتُمْ أَحْسَنْتُمْ لِأَنفُسِكُمْ

"Jika kalian berbuat baik, sesungguhnya kalian berbuat baik bagi diri kalian sendiri"
(QS. Al-Isra': 7)

خَيْرُ النَّاسِ أَنْفَعُهُمْ لِلنَّاسِ

"Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia" (HR. Ahmad, ath-Thabrani, ad-Daruqutni)

**APA GUNANYA HIDUP, JIKA TIDAK
MENEBAR MANFAAT?**

Dalam urusan dunia, jangan berfikir bagaimana mendapat, tapi berfikirlah bagaimana memberi. Jika prinsipmu adalah memberi, maka kau akan dapatkan apa yang kau beri.

(Hanin, 2018)

HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya ini ku persembahkan untuk:

1. Ibuku tersayang, (Bu Buduriah) yang selalu menyanyangiku. Terimakasih telah mengandungku, melahirkanku, mendidikku. Doa-doamu tiap malam selalu tak lupa menyebut nama anakmu ini yang nakal dan belum bisa membanggakanmu. Temikasih atas segalanya. Semoga Allah SWT senantiasa memeberikan hadiah surga untukmu.
2. Babaku tercinta (Muhaimin), terimakasih Ba atas kasih sayang yang kau berikan selama ini. Engkau banting tulang hanya untuk menuruti segala egoku. Terimakasih atas semangat dan motivasinya.
3. Kedua adikku (Nida Helwa Hanin) dan (Ahmad Nabil). Terimaksih telah menyemangatiku untuk segera menyelesaikan tugas akhir ini, maaf belum bisa menjadi kakak yang terbaik buat kalian.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah yang telah dilimpahkan-Nya sehingga skripsi dengan judul “**Identifikasi Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi Dan Analisis rDNA ITS (Internal Transcribed Spacer)**” ini dapat diselesaikan dengan baik. Sholawat serta salam semoga tercurahkan kepada Nabi Muhammad ﷺ yang telah mengantarkan manusia ke jalan kebenaran.

Penyusunan skripsi ini tentu tidak lepas dari bimbingan, bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Harini, M.Si, selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Romaidi, M. Si., D. Sc, selaku Ketua Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc. dan Mujahidin Ahmad, M.Sc., selaku dosen pembimbing yang dengan penuh keikhlasan, dan kesabaran telah memberikan bimbingan, pengarahan dan motivasi dalam penyusunan skripsi ini.
5. Dra. Hj. Ulfa Utami, M.Si selaku dosen wali sekaligus dosen penguji dan Ibu Nur Kusmiyati, M.Si yang telah memberikan saran, nasehat dan dukungan sehingga penulisan skripsi dapat terselesaikan.
6. Seluruh dosen, Laboran Jurusan Biologi dan Staf Administrasi yang telah membantu dan memberikan kemudahan, terimakasih atas semua ilmu dan bimbungannya.
7. Kedua orang tuaku Ibu Buduriah dan Baba Muhammin, yang selalu memberikan do'a, semangat, serta motivasi kepada penulis sampai saat ini.
8. Untuk Ibu Shinta, M.Si terimakasih banyak telah memberikan pelajaran berharga di luar akademik, membuat penulis mengerti dan memahami.

9. Bapak Didik Wahyudi, M.Si terimakasih telah mengajari saya bagaimana mengelola waktu dan selalu menyemangati saya agar tidak kalah dengan kampus luar.
10. Temanku Mif, Mbk Sod, Mb Us, Septian, Fika, Alya, terimakasih ya sudah mau menemani *nge-lab* sampai malam hari.
11. Teman-teman Biologi A sampai D, terimakasih telah menjadi sahabat dan keluarga selama 4 tahun perkuliahan, dan seluruh teman-teman Jurusan Biologi angkatan 2013, yang berjuang bersama-sama menyelesaikan studi sampai memperoleh gelar S.Si.
12. Sahabat-sahabatku Fifit, Nissa', Afan, Hari, Nisul, Ana, Uul, Maslaha, Ayu, Aldila, Eva, terimakasih selalu menghibur dan memberiku semangat untuk kesuksesanku.
13. Untuk Eli dan Fauqi (calon S.Si) terimakasih banyak telah menjadi patner penelitian satu bimbingan, tanpa kalian aku tak ada apa-apanya.
14. Adek-adek biologi angkatan 2015-2017 yang membuatku belajar memahami dan mendengar semoga penelitian ini bermanfaat untuk kalian.
15. Terimakasih untuk “kamu”, yang selalu mengirim doa-doamu padaku dengan diammu tanpa ku tahu.
16. Bapak *security*, terimakasih ya mau sabar nunggu ngelab saya sampai malam. Maaf selalu telat pulang tepat waktu.
17. Semua pihak yang ikut membantu dan memberikan dukungan baik moril maupun materiil dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberi manfaat bagi penulis khususnya, dan bagi para pembaca pada umumnya. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan ilmu yang bermanfaat dan melimpahkan Rahmat dan Ridho-Nya. Amin.

Malang, 21 Juni 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
ملخص	xvii

BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.2 Tujuan	7
1.3 Hipotesis	7
1.4 Manfaat	8
1.5 Batasan Masalah	8
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Tanaman Juwet.....	9
2.1.1 Klasifikasi Tanaman Juwet	9
2.1.2 Botani Umum	9
2.1.3 Distribusi dan Habitat.....	13
2.1.4 Masa Berbuah.....	14
2.1.5 Manfaat Tanaman Juwet	14

2.1.6 Fitokimia Tanaman Juwet	15
2.2 Fungi Endofit	15
2.3 Asosiasi Fungi Endofit dengan Tanaman Inang	17
2.4 Identifikasi Fungi Endofit	20
2.4.1 Identifikasi Morfologi	21
2.4.1.1 Identifikasi secara Makroskopis	22
2.4.1.2 Identifikasi secara Mikroskopis	22
2.4.2 Identifikasi secara Molekuler	24
2.5 Filogenetik	28
2.5.1 Hubungan analisis filogenetika dengan <i>alignment</i>	29
2.5.2 Metode <i>Neighbor joining</i>	32
2.5.3 Metode Bootstrap	32
BAB III METODE PENELITIAN	35
3.1 Rancangan Penelitian	35
3.2 Waktu dan Tempat	35
3.3 Alat dan Bahan	35
3.4 Prosedur Penelitian	36
3.5 Analisis Data	44
BAB IV PEMBAHASAN	46
4.1 Isolat Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (<i>Syzygium cumini</i> L.)	
Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi.....	46
4.2 Identifikasi Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (<i>Syzygium cumini</i> L.) Skeels Berdasarkan Penanda Molekuler rDNA ITS	56
4.3 Perbandingan Isolat Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (<i>Syzygium cumini</i> L.) Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda Molekuler	64
BAB V PENUTUP	67
5.1 Kesimpulan	67
5.2 Saran	68
Daftar Pustaka	69
Lampiran	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi Tanaman Juwet	13
Gambar 2.2 Skema hipotesis mekanisme produksi metabolit sekunder tanaman inang dan endophytic fungi (EF).....	19
Gambar 2.3 Skema struktur universal wilayah rDNA (a)Kromosom lokasi wilayah rDNA	26
Gambar 2.4 Diagram lokasi primer dalam ribosom yang terdiri dari SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, dan LSU rDNA.....	27
Gambar 2.5 Sekuen 1 dan 2 diasumsikan berasal dari nenek moyang yang sama (<i>common ancestor</i>)	30
Gambar 4.1 Isolat F1	49
Gambar 4.2 Isolat F2.....	51
Gambar 4.3 Isolat S1	53
Gambar 4.4 Isolat S2.....	54
Gambar 4.5 Isolat S3.....	56
Gambar 4.6 Visualisasi hasil PCR (100 volt, 30 menit	57
Gambar 4.7 Rekontruksi pohon filofenetik isolat F1, F2, S1, S2, S3.....	62

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan kimia pada masing-masing bagian tabaman juwet (<i>S. cumini</i>)	15
Tabel 2.2 Sequens primer daerah ITS dan suhu annealing.....	28
Tabel 3.1 Sequens primer	43
Tabel 3.2 Komposisi bahan dan volum amplifikasi DNA.....	43
Tabel 3.3 Prosedur PCR.....	44
Tabel 4.1 Hasil Isolasi Fungi Endofit dari organ buah dan biji juwet	46
Tabel 4.2 Karakter Morfologi Isolat Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (<i>Syzygium cumini</i> L.) Skeels	47
Tabel 4.3 Hasil Blast sekuensing pada NCBI	59

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Formula Pembuatan 2x CTAB	78
Lampiran 2 Modifikasi Metode Doyle & Doyle.....	79
Lampiran 3 Kunci Determinasi	80
Lampiran 4 Hasil Uji Kuantitatif dan Kualitatif	82
Lampiran 5 Hasil Sequence scanner	84
Lampiran 6 Jarak Genetik dan Similaritas	86
Lampiran 7 Pensejajaran Aligment.....	87
Lampiran 8 Isolat F1	89
Lampiran 9 Isolat F2	90
Lampiran 10 Isolat S1	91
Lampiran 11 Isolat S2	92
Lampiran 12 Isolat S3	93

ABSTRAK

Hanin, Nada Asmara. 2018. Identifikasi Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi dan Analisis rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing Biologi: Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc. Pembimbing Agama: Mujahidin Ahmad, M.Sc.

Kata Kunci : Identifikasi, Fungi endofit, Juwet, Morfologi, rDNA, ITS

Tanaman juwet merupakan tanaman kaya akan manfaat. Semua bagian organ dari tanaman juwet dapat digunakan sebagai tanaman obat. Salah satu organ tanaman juwet yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah buah dan bijinya. Pemanfaatan tanaman juwet sebagai obat dibatasi oleh musim sehingga diperlukan cara mengoptimalkan pemanfaatan juwet tanpa dibatasi musim. Salah satu strategi adalah mengisolasi fungi endofit dari tanaman inangnya. Identifikasi fungi endofit dari buah dan biji *S. cumini* penting dilakukan untuk mengetahui spesies fungi endofit. Identifikasi dilakukan secara morfologi dan molekuler. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk (1) mengetahui karakter morfologi isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels. (2) mengetahui spesies isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels berdasarkan penanda molekuler. Metode yang digunakan; isolasi fungi endofit, identifikasi morfologi (makroskopis dan mikroskopis), identifikasi molekuler rDNA ITS primer ITS1 dan ITS4, sekvensing, dan rekonstruksi pohon filogenetika. Kesimpulan dari penelitian ini adalah (1) karakter morfologi isolat F1 tekstur halus, seperti kapas, warna abu-abu muda, konidium elips, ada sekat. Isolat F2 seperti kapas, putih, konidium elips, 2 *setulae* dan 1 *pedeciel*. Isolat S1 permukaan kasar, miselium tipis, coklat muda, tipe α -konidia konidium elips. Isolat S2 tekstur permukaan halus, seperti kapas, putih, konida hialin. Isolat S3 permukaan rata, miselium tipis, warna putih, konidium elips, ujung tumpul, hialin. (2) berdasarkan penanda molekuler rDNA ITS spesies isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels isolat F1 *Neofusicoccum parvum*, isolat F2 *Pestalotiopsis vismiae*, isolat S1 *Phomopsis* sp., isolat S2 *Colletotrichum fructicola*, dan isolat S3 *Phomopsis* sp.

ABSTRAC

Hanin, Nada Asmara. 2018. Identification Endophytic Fungi from Fruit and Seed Jambolana (*Syzygium cumini* L.) Skeels Based on Morphology Character and rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*) Analysis. Skripsi. Biology Departement Science and Technology Faculty Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang. Lecture of Biology: Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc. Lecture of religion: Mujahidin Ahmad, M.Sc.

Keywords: Identification, Endophytic Fungi, Jambolana, Morphology, rDNA, ITS

Jambolana (*Syzygium cumini* L.) Skeels is a plant that is rich in benefits. All the organs from jambolana can be used as medical plant. One of organs that can be used as medicine is fruit and seeds. Jambolana is seasonal fruit. A strategy to optimize usage Jambolana without limitation of seasonal is isolation endophytic fungi. Identification of endophytic fungi from *S. cumini* it is important to know the species of endophytic fungi. Identification using morphology character and molecular. The purpose of this study are to (1) to know the morphological character of endophytic fungi isolates from fruit and seeds Jambolana (*Syzygium cumini* L.) Skeels. (2) to know the species of endophytic fungal isolates from fruit and seeds Jambolana (*Syzygium cumini* L.) Skeels based on molecular markers. The method used; isolation of endophytic fungi, morphologic identification (macroscopic and microscopic), identification of rDNA ITS, sequencing, and reconstruction of phylogenetic trees. The results of this study were (1) based on the morphology character of F1 fine texture isolate, such as cotton, light gray color, elliptical conidium, there is bulkhead. Isolate F2 is a rough surface, such as cotton, white, elliptical conidium, 2 setulae and 1 pedicel. S1 surface is coarse, thin, light brown, α -conidia conidial ellipse type. Isolate S2 fine surface texture, such as cotton, white, hyaline conida. Isolate S3 surface flat, thin mycelium, white color, conidia ellipse, blunt tip, hyaline. (2) based on the rDNA molecular marker of the isolate of endophytic fungi isolates of juwet fruits and seeds (*Syzygium cumini* L.) F1 isolates *Neofusicoccum parvum*, F2 isolates *Pestalotiopsis vismiae*, isolates S1 *Phomopsis* sp., Isolates S2 *Colletotrichum franticola*, and isolate S3 *Phomopsis* sp .

ملخص البحث

حنين، ندى أسمارا. 2018. تحديد الفطر الإنديوفيت (نابوت داخلي) من الفواكه والبذور جوبيت rDNA Skeels (*Syzygium cumini* L.) بناء على أحرف مورفولوجيا وتحليل الحمضITS (Internal Transcribed Spacer). البحث الجامعي. قسم علم الأحياء (بيولوجيا بكلية العلوم والتكنولوجيا بجامعة الإسلامية الحكومية مولانا مالك إبراهيم مالانج. الإشراف: فريليا ديوى فطرياسارى، الماجستير، المشرف الدين: مجاهدين أحمد، الماجستير

الكلمات الرئيسية: تحديد والفطر الإنديوفيت، جوبيت، والمورفولوجية وITS rDNA

جوبيت هو واحد من النباتات التي لها غني بالفوائد. جميع أجزاء أجهزة نبات جوبيت يمكنون أن يستخدموا كنباتات طبية. أحدها هي الشمار والبذور. استخدام نبات جوبيت كأدوية يحدد موسم فيستفيد المثلثي من جوبيت دون الموسم محدودة. إحدى الإستراتيجيات هي مع عزل الفطر الإنديوفيت من النبات المصيف. تحديد الإنديوفيت من الفواكه والبذور *S. cumini* هو مهم لأن يعرف نوع من الفطريات الإنديوفيت. يحدد مورفولوجيا وجزئيا. وأما الأهداف من هذا البحث فهي (1) تحديد الصفات المورفولوجية المعزولة للفطريات الإنديوفيت من الفواكه والبذور جوبيت (*Syzygium cumini* L.) Skeels . (2) تحديد الأنواع من المعزولة للفطريات الإنديوفيت من الفواكه والبذور جوبيت (*Syzygium cumini* L.). Skeels بناء الواسمات الجزيئية. الطريقة المستخدمة هي عزل الفطريات الإنديوفيت ، وتحديد المورفولوجية (العيانية والمخمرة)، وتحديد الجزيئي ITS rDNA الأساسي ITS1 و ITS4، والتسلسل، إعادة الإعمار على شجرة تطورية. وكان ملخص هذا البحث (1) الصفات المورفولوجية من عزل F1 لنسيج ناعم ، مثل القطن، اللون الرمادي ، كانيديوم القطع الناقص و الحاجز، العزل F2 يعزل مثل القطن، والأبيض، كانيديوم القطع الناقص، 2 pedeciel setulae و 1. العزل S1 من السطح الخشن، أقطورة رقيقة، البني الفاتح، نوع ألفا لقينيديا كانيديوم القطع الناقص. يعزل S2 من السطح الخشن، مثل القطن والأبيض، والكانيدا هيلين. العزل S3 من السطح المستو، الأقطورة الرقيقة والأبيض، والقينيديا القطع الناقص، الرأس الحادة، الميلين. (2) بناء على علامات الجزيئية ITS rDNA لأنواع الفطريات المعزولة الإنديوفيت من الفواكه والبذور جوبيت (*Neofusicoccum* Skeels (*Syzygium cumini* L.) هو F1 وعزل *Phomopsis* sp. هو *Pestalotiopsis vismiae* *parvum*. العزل F2 هو *Phomopsis* sp. ، العزل S1 هو *Colletotrichum fructicola* S2 هو *Phomopsis* sp. ، العزل S3 هو

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Allah ﷺ berfirman dalam surat As-Syu'araa (26) ayat 7 – 8:

أَوْلَمْ يَرَوُا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتَنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً وَمَا كَانَ أَكْثُرُهُمْ
مُّؤْمِنِينَ

Artinya: “dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah. dan kebanyakan mereka tidak beriman.” (QS. As-Syu'araa' /26:7 - 8).

Kalimat زوج كريم pada surat Asy-Syu'araa' ayat 7 menurut Al-Mahalli dan As-Syuthi (2010) memiliki makna “bermacam-macam jenis tumbuh-tumbuhan yang baik.” Menurut Al-Qurthubi (2009) memiliki makna “*Tanaman mulia, tanaman unggul.*” Menurut Ar-Rifa'i (2008) memiliki makna “*Jenis tumbuh-tumbuhan yang baik dan bermanfaat.*” Menurut Shihab (2002) زوج berarti “pasangan.” Pasangan yang dimaksud adalah tumbuh-tumbuhan, karena tumbuhan muncul di celah-celah tanah yang terhampar di bumi. Selanjutnya kata لآية pada ayat 8 memiliki makna “*bukti yang menunjukkan kesempurnaan kekuasaan Allah.*”

Berdasarkan firman Allah ﷺ dan beberapa tafsir di atas, manusia diperintahkan untuk memperhatikan bumi tentang macam-macam tumbuhan yang hidup di bumi. Kata “*berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik*” ini dapat dijelaskan sebagai tumbuhan yang memiliki manfaat misalnya sebagai tanaman

obat. Dengan mengetahui berbagai macam tumbuhan yang baik sebagai obat dapat menunjukkan tanda kekuasaan Allah ﷺ atas segala sesuatu.

Salah satu tanaman yang digunakan sebagai tanaman obat adalah tanaman juwet (*Syzygium cumini*) (L.) Skeels. Tanaman juwet merupakan salah satu spesies dari famili jambu-jambuan (Myrtaceae) (Chase and Reveal, 2009). Tanaman ini termasuk dalam golongan buah tropis Asia (Sivasubramaniam and Selvarani, 2012). Buah ini memiliki nama lain diantaranya *Myrtus cumini* Linn., *Syzygium jambolana* DC., *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC., *Eugenia djouant* Perr., *Calyptrothecia jambolana* Willd., *Eugenia cumini* (Linn.) Druce. dan *Eugenia caryophyllifolia* Lam. (Ayyanar and Pandurangan, 2012). Di Indonesia buah ini memiliki nama lokal diantaranya jambu koliong (Riau), jambulan (Flores), Jambu Kalang (Minangkabau), Juwet (Betawi), jujutan (Bali), Juwet atau duwet (Jawa) (Heyne, 1987).

Tanaman juwet merupakan tanaman yang kaya akan manfaat. Semua bagian organ dari tanaman juwet dapat digunakan sebagai tanaman obat dalam pengobatan alternatif (Reynetron *et al.*, 2005). Organ-organ tanaman tersebut memiliki senyawa metabolit sekunder yang berbeda-beda pada setiap organ.

Salah satu organ tanaman juwet yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah organ buahnya. Pemanfaatan dari buah juwet ini digunakan sebagai antioksidan (Brito *et al.*, 2007), antikanker (Li *et al.*, 2009), antihyperlidemic (Rekha *et al.*, 2010). Hal ini dikarenakan buah juwet mengandung asam malat dan sejumlah kecil asam oksalat, *gallic acid*, tanin, antosianin, flavanoid, glukosa, fruktosa, mannose, dan galaktosa. Mineral yang terkandung dalam buah juwet meliputi Ca,

Mg, Na, K, Cu dan vitamin seperti tiamin, riboflavin, asam nikotinat (Veigas *et al.*, 2007; Vijayanand *et al.*, 2001).

Organ lain dari tanaman juwet yang banyak dimanfaatkan adalah bijinya. Pemanfaatan dari biji juwet ini digunakan sebagai obat diabetes (Farswana *et al.*, 2009), antioksidan (Loganayaki and Manian, 2010), antibakteri (Meshram *et al.*, 2011), antiinflamasi (Kumar *et al.*, 2008), tukak lambung (Chaturvedi *et al.*, 2007). Hal ini dikarenakan biji juwet mengandung alkaloid, jambosine, glikosida jambolin atau antimellin, *asam ellagic*, flavonoid, fenolat, protein, dan kalsium (Sagrawat and Kharya, 2006).

Tanaman juwet merupakan tanaman musiman atau tahunan. Di Pulau Jawa, pohon juwet berbunga pada bulan Juli sampai Agustus dan berbuah pada bulan September sampai Oktober (Rohadi, 2016) sehingga buah juwet hanya dapat ditemukan pada bulan dimana juwet sedang berbuah. Pemanfaatan tanaman juwet sebagai obat yang dibatasi oleh musim diperlukan suatu cara untuk mengoptimalkan pemanfaatan tanaman juwet pada saat musimnya. Strobel & Daisy (2003) menjelaskan salah satu strategi pengoptimalkan tanaman yang hanya tumbuh pada musim tertentu adalah dengan mengisolasi mikroba endofit dari tanaman inangnya.

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup pada jaringan internal tanaman inang tanpa menyebabkan kerusakan pada tanaman inang (Bacon, 2000). Senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh mikroba endofit dapat memproduksi sejumlah besar metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan dan

diterapkan oleh manusia sebagai sumber obat berbagai penyakit (Zhang *et al.*, 2006; Firakova *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2009).

Mikroba endofit pada umumnya terdiri atas golongan fungi dan bakteri (Prasetyoputri, 2006). Bakteri adalah mikroba golongan prokariotik, sedangkan fungi adalah mikroba golongan eukariotik (Schulz & Boyle, 2006). Fungi endofit pada penelitian ini dijadikan sebagai kandidat yang akan diisolasi. Volume sel dari organisme eukariotik lebih besar dari organisme prokariotik (Subowo, 2011). Menurut Fahn (1991) menjelaskan organisme eukariotik memiliki organel vakuola. Salah satu fungsi vakuola adalah menyimpan beberapa hasil reaksi kimia dan reaksi metabolism diantara senyawa metabolit sekunder.

Beberapa fungi endofit dapat menghasilkan beragam fitokimia-metabolit sekunder yang berasal dari tanaman, fungi endofit lainnya bisa mempromosikan pembentukan dan akumulasi metabolit sekunder yang hanya diproduksi oleh tanaman inang (Wang, 2006).

Allah ﷺ berfirman di dalam Al-qur'an surat An-Nahl ayat 13 yaitu:

وَمَا ذَرَأْلَكُمْ فِي الْأَرْضِ مُخْتَلِفًا أَلْوَانُهُ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَذَّكَّرُونَ

Artinya: “ Dan (Dia juga mengendalikan) apa yang diciptakan untukmu di bumi ini dengan berbagai jenis dan macam warnanya. Sungguh, pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang mengambil pelajaran.” (QS. An-Nahl/16:13).

Menurut Ibnu Katsir (2004) menguraikan tentang surat An-Nahl ayat 13 bahwa makna مُخْتَلِفًا أَلْوَانَهُ adalah “Berbagai macam warna dan bentuknya termasuk kegunaan dan keistimewaannya.” Menurut Shihab (2002) bermakna “Aneka makhluk hidup yang berlainan bentuk dan ciri-cirinya.” Sedangkan menurut

menurut Al-Mahalli dan As-Syuthi (2010) bermakna “(*dengan berlain-lainan warnanya) seperti ada yang merah, kuning, hijau dan sebaginya.*” Menurut Al-Qurthubi (2009) makna مختفاً adalah “*Berlain-lain,*” san kalimat ألونه memiliki makna “*Macam-macamnya*” adalah bentuk pada penampilannya.”

Berdasarkan firman Allah ﷺ dan beberapa tafsir di atas makna “*berbagai jenis dan macam warnanya*” dalam surat An-Nahl ayat 61 tersebut dapat dikaitkan tentang berbagai macam makhluk hidup ciptaan Allah ﷺ salah satunya adalah fungi endofit. Terdapat berbagai jenis warna, bentuk, karakter morfologi, susunan DNA, manfaat dari fungi endofit yang berkoloni pada tanaman inang juwet.

Hal ini yang mendasari diperlukan pengidentifikasi fungsi endofit penting untuk dilakukan, sehingga dapat diketahui jenis dari isolat yang didapatkan. Pengidentifikasi fungsi endofit dilakukan dengan cara identifikasi berdasarkan karakter morfologi. Pengidentifikasi morfologi dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi secara morfologi penting dilakukan, karena setiap jenis fungsi memiliki karakter morfologi yang berbeda-beda dan dapat menjadi ciri khusus suatu genus bahkan spesies.

Identifikasi secara morfologi memiliki kekurangan diantaranya proses identifikasi dapat menimbulkan kesalahan pengidentifikasi pada spesies-spesies yang berkerabat dekat (Singh, 2012). Oleh karena itu, disamping idendifikasi morfologi pengidentifikasi secara molekuler juga perlu dilakukan. Menurut Fell (2000) menjelaskan identifikasi spesies secara molekuer dapat mendapatkan hasil identifikasi yang tepat dan akurat pada spesies.

Identifikasi secara molekuler pada penelitian ini menggunakan karakter pengenal daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosom. Menurut Vicente *et al.*, (2005), pemilihan DNA ribosom untuk tujuan identifikasi suatu organisme didasarkan pada: (1) sifat homolog pada berbagai organisme yang berbeda, (2) terdapat banyak di dalam sel, (3) sekuenya berkisar 500 – 800 bp sehingga memungkinkan dilakukannya uji statistik untuk melihat perbedaannya satu sama lain.

Daerah ITS merupakan daerah yang memiliki variasi sekuen tinggi. Hal ini dikarenakan pada daerah tersebut merupakan daerah *noncoding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi daripada daerah *coding* (James, 1996). Dengan demikian, analisis molekuler berupa perbandingan daerah ITS rDNA dapat dilakukan pada beberapa spesies yang berkerabat dekat.

Analisis molekuler dilakukan melalui konstruksi sejarah evolusi dan hubungan evolusi antara keturunan dengan nenek moyangnya berdasarkan pada kemiripan karakter sebagai dasar dari perbandingan (Lipscomb, 1998). Jenis analisis yang diketahui dengan baik adalah analisis filogenetika. Salah satu diantara tujuan filogenetika adalah mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya (Li *et al.*, 1999). Berdasarkan analisis, sekuen yang mempunyai kedekatan dapat diidentifikasi dengan menempati cabang yang bertetangga pada pohon filogenetika. Hubungan filogenetika diantara gen organisme atau kelompok organisme dapat memprediksikan kemungkinan fungsi yang ekuivalen.

Identifikasi fungi endofit dari buah dan biji *S. cumini* penting dilakukan untuk mengetahui spesies fungi endofit sebagai aplikasi peningkatan senyawa bioaktif dari tanaman inang. Hal ini yang melatarbelakangi tentang penelitian identifikasi fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels berdasarkan karakter morfologi dan analisis rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana karakter morfologi isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels?
2. Apa saja spesies isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels berdasarkan penanda molekuler rDNA ITS?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui karakter morfologi isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels.
2. Mengetahui spesies isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels berdasarkan penanda molekuler.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Terdapat beberapa isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels dengan karakter morfologi dan jenis yang berbeda-beda.
2. Terdapat isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels dengan jenis spesies yang berbeda-beda.

1.5 Manfaat

1.5.1 Manfaat Akademis

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi tentang jenis spesies fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels berdasarkan karakter morfologi dan penanda molekuler.
2. Dapat memberi informasi keanekaragaman fungi endofit (*Syzygium cumini* L.) Skeels.

1.5.2 Manfaat Praktis

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Eksplorasi fungi endofit ini adalah untuk memanfaatkan keuntungan dari fungi endofit yang dapat mempromosikan akumulasi metabolit sekunder yang awalnya hanya diproduksi oleh tanaman inang saja.
2. Dapat memanfaatkan fungi endofit sebagai penghasil senyawa obat.

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Buah dan biji *Syzygium cumini* (L.) Skeels ini diambil dari pohon berada pada wilayah Kabupaten Malang, desa Dampit.
2. Identifikasi fungi endofit menggunakan pengamatan morfologi (makroskopis dan mikroskopis) dan molekuler.
3. Primer yang digunakan adalah ITS1 dan ITS4.
4. Tingkat similaritas yang digunakan untuk blast spesies 99%.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels

2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi *Syzygium cumini* (L.) Skeels adalah (Dasuki, 1991):

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Sub Kelas : Rosidae

Ordo : Myrtales

Famili : Myrtaceae

Genus : Syzygium

Spesies : *Syzygium cumini* (L.) Skeels

2.1.2 Botani Umum

Allah ﷺ berfirman di dalam Al-Qur'an surat Al-An'am (6) ayat 141 yaitu:

وَهُوَ الَّذِي أَنْشَأَ جَنَّتٍ مَعْرُوشَاتٍ وَغَيْرَ مَعْرُوشَاتٍ وَالنَّخْلَ وَالزَّرْعَ مُخْتَلِفًا أُكَلُّهُ
وَالرَّيْتُونَ وَالرُّمَادَ مُتَشَبِّهًاتٍ وَغَيْرِ مُتَشَبِّهٍ كُلُّوْا مِنْ ثَمَرَةٍ إِذَا أَثْمَرُوهُ اتُوا حَقَهُ وَيَوْمَ
حَصَادِهِ وَلَا تُسْرِفُوا إِنَّهُ لَا تُحِبُّ الْمُسْرِفِينَ ﴿٦﴾

Artinya: “Dan Dialah yang menjadikan tanaman-tanaman yang merambat dan yang tidak merambat, pohon kurma, tanaman yang beranekaragam rasanya, zaitun dan delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan tidak serupa (rasanya). Makanlah buahnya apabila ia berbuah dan berikanlah haknya (zakatnya) pada waktu memetik hasilnya, tapi janganlah berlebih-lebihan.

Sesungguhnya Allah tidak menyukai orang-orang yang berlebih-lebihan.” (Q.S.Al-An’am (6): 141).

Kalimat *والزيتون والرمان متشبها وغير متشبها* pada surat Al-An’am (6) ayat 141 menurut Al-Mahalli dan As-Syuthi (2010) memiliki makna “(*dan zaitun dan delima yang serupa*) *dedaunannya; menjadi hal* (*dan tidak sama*) *rasa keduanya.*” Menurut Al-Jazairi (2006) kalimat *متشبها* memiliki makna “*yang mempunyai kemiripan daun, akan tetapi berbeda buah dan rasanya.*” Menurut Ali (1989) memiliki makna “*Setiap buah walaupun memiliki persamaan jenis, akan memiliki perbedaan diantaranya bentuk, ukuran, warna, khasiat, dan sebagainya.*”

Berdasarkan tafsir tersebut menjelaskan tentang berbagai jenis tanaman yang memiliki karakteristik morfologi dan manfaat masing-masing. Delima merupakan salah satu tumbuhan yang disebutkan di dalam Al-Qur'an dan merupakan buah surga sehingga buah ini pasti memiliki manfaat bagi kehidupan manusia. Ditinjau dari taksonomi, Delima merupakan salah satu dari Ordo Myrtales. Selain delima, tanaman lain dari Ordo Myrtales adalah tanaman juwet. Manusia sebagai ulul albab harus menggali sumber-sumber informasi sesuai dengan kutipan “*delima yang serupa (bentuk dan warnanya) dan tidak serupa (rasanya)*”. Hal ini dapat ditinjau dari tanaman lain yang serupa satu ordo dengan buah delima, contohnya adalah mengeksplorasi tanaman juwet.

Tanaman juwet merupakan tanaman yang digolongkan kepada tumbuhan berbiji atau tumbuhan tingkat tinggi yang ditandai oleh ciri- ciri berikut;

- 1.)Pembentukan tabung sari oleh serbuk sari setelah penyerbukan,

2.) Dihasilkan biji yang umumnya mengandung sebuah embrio atau tumbuhan baru yang dorman. Tumbuhan baru ini akan berkecambah pada lingkungan baru yang sesuai (Cronquist, 1981).

Golongan tumbuhan berbiji dibagi menjadi dua kelompok besar yang memiliki perbedaan atas dasar perlindungan terhadap bakal biji (ovul) sebelum dan sesudah pembuahan, yaitu tumbuhan berbiji terbuka (Pinophyta) dan tumbuhan berbiji tertutup (Magnoliophyta) (Cronquist, 1981). Tanaman juwet digolongkan pada tumbuhan biji tertutup. Hal ini dikarenakan memiliki bakal biji tertutup sempurna yang dinamakan sebagai bakal buah (Verheji & Coronel, 1997).

Sifat-sifat utama dari divisi Magnoliophyta adalah: 1) adanya trakea dalam xylem; 2) adanya elemen tapis (*“sieve elemen”*) dan sel pengantar dalam floem; 3) kantung embrio dengan delapan inti (satu telur, dua sinergid, tiga antipoda, dan dua inti polar; 4) pembuahan ganda; 5) karpel yang menutup (Cronquist, 1981).

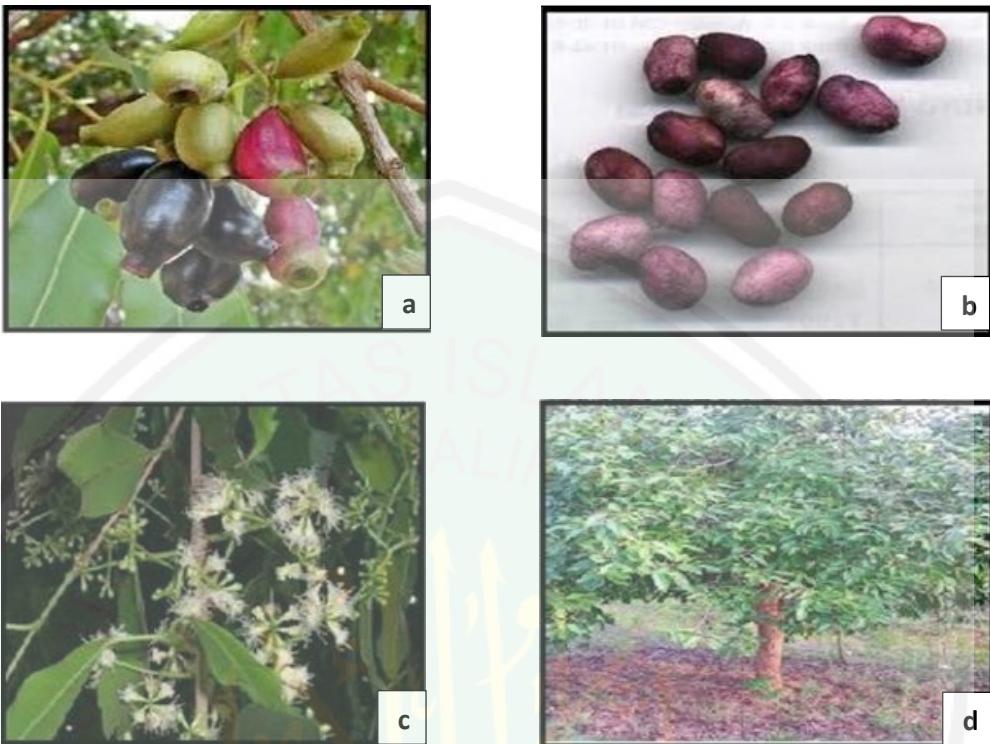
Divisi Magnoliophyta mencangkup semua tumbuhan yang berbiji tertutup. Kelompok ini terdiri dari dua anak kelompok besar yaitu tumbuhan berkeping biji satu (Monocotyledon) dan tumbuhan berkeping biji dua (Dicotyledon). Untuk memenuhi aturan-aturan pada kose Internasional Tata Nama Tumbuhan, digunakan nama latin yaitu untuk Kelas Magnoliopsida untuk tumbuhan berkeping biji dua dan Kelas Liliopsida untuk tumbuhan berbiji satu. Tanaman juwet digolongkan pada kelas Magnoliopsida, hal ini karena juwet adalah tanaman biji berkeping dua (Angiospermae) (Verheji & Coronel, 1997).

Sifat-sifat utama dari kelas Magnoliopsida adalah berkeping biji dua, ikatan pembuluh dalam satu lingkaran, sistem akar adalah primer dan adventif, habitus

adalah berkayu. Kelas dari Magnoliopsida terdiri dari enam anak kelas. Tanaman juwet ini digolongkan pada anak kelas (sub kelas) Rosidae. Hal ini dikarenakan bunganya mempunyai banyak stamen yang masak dengan urutan sentripetal., ovula bitegmik atau unitegmik, crassinucellate atau tenuicellate (Cronquist, 1981).

Tanaman juwet digolongkan ke dalam famili Myrtaceae. Ciri dari famili ini adalah; perawakan pohon, mengandung minyak atsiri (macam-macam monoterpen, sequterpen, triterpen, polifenol), bertanin, kadang-kadang menghasilkan saponin, kulit batang mudah mengelupas, daun tersebar, tunngal. Stipula tereduksi, baunga dalam macam-macam simosa, stamen banyak, Pohon juwet memiliki ciri kulit tebal dan mudah mengelupas. Tinggi pohon sekitar 1 – 2 meter, diameternya sekitar 40-90 cm, batang bercabang banyak, daunnya tunggal, bentuk daun bulat telur terbalik, pangkal lebar, tepinya rata, tulang daun menyirip, permukaan daun mengkilap, daun warna daun hijau (Verheji & Coronel, 1997).

Pohon juwet memiliki bunga majemuk malai cabang yang berjauhan, bunga duduk, tumbuh pada area tepi daun di ujung percabangan, kelopak bunga berbentuk lonceng warna hijau muda, mahkota bunga berbentuk bulat telur, benag sari banyak, warna putih, bau harum, bakal buahnya 2-3 ruang, tangkai putik 6-7 mm. Tanaman juwet memiliki buah berwarna ungu gelap kehitaman. Buah berdaging, buni, lonjong, panjang sekitar 2-3 cm, buah muda warna hijau, sedangkan buah yang masak berwarna ungu kehitaman, buah bergerombol. Morfologi tanaman juwet disajikan pada gambar 2.1. (Pradhanan, 2016).



Gambar 2.1 Morfologi Tanaman Juwet

a) Buah, b) Biji, c) Bunga dan Daun, d) Pohon (Pradhanan, 2016)

2.1.3 Distribusi dan Habitat

Tanaman Juwet adalah tanaman yang berasal dari Asia dan Australia tropis.

Tanaman ini terdistribusi pertumbuhannya di Bangladesh, India, Nepal, Pakistan dan Indonesia (Srivastava and Chandra, 2013). Tanaman juwet dapat tumbuh pada pekarangan atau tumbuh liari. Juwet dapat tumbuh di dataran rendah sampai ketinggian 500 m dpl (Dalimatra, 2003; BPPT, 2005).

Tanaman juwet dapat tumbuh baik pada daerah ketinggian sekitar 1800 m dpl. tanaman ini dapat tumbuh pada daerah tanah berpasir, kering, tanah lempung, bahkan daerah berkapur. Tanaman ini kurang optimum pertumbuhannya pada daerah lembab atau tanah basah (Morton, 1987).

2.1.4 Masa Berbuah

Tanaman juwet memiliki masa pertumbuhan yang berbeda-beda antar negara. Di India dan Florida, juwet berbunga pada bulan Februari sampai bulan Maret. Di Filipina, juwet memulai pertumbuhan sekitar pertengahan bulan Mei sampai pertengahan bulan Juni. Di Sri Lanka, juwet mulai berbunga pada bulan Mei hingga Agustus, sedangkan di Indonesia tanaman Juwet mulai berbunga pada bulan Juli sampai Agustus dan buah matang bulan September hingga Oktober (Morton, 1987). Pembentukan buah juwet berlangsung sekitar 32 hari setelah masa pertumbuhan. Buah yang matang ditandai dengan warna ungu kehitaman (Chaudhary and Mukhopadhyay, 2012).

2.1.5 Manfaat Tanaman Juwet

Tanaman juwet merupakan tanaman yang kaya akan manfaat. Semua bagian organ dari tanaman juwet dapat digunakan sebagai tanaman obat dalam pengobatan alternatif. Menurut Reynetron *et al.*, (2005) pada beberapa negara, buah ini telah digunakan sebagai obat berbagai macam penyakit, termasuk batuk, diabetes, disentri, peradangan dan kurap.

Pemanfaatan dari buah juwet ini digunakan sebagai antioksidan (Brito *et al.*, 2007), antikanker (Li *et al.*, 2009), antihyperlidemic (Rekha *et al.*, 2010). Daging buahnya dapat digunakan sebagai bahan dasar minuman. Pemanfaatan dari biji juwet ini digunakan sebagai obat diabetes (Farswana *et al.*, 2009), antioksidan (Loganayaki and Manian, 2010), antibakteri (Meshram *et al.*, 2011), antiinflamasi (Kumar *et al.*, 2008), tukak lambung (Chaturvedi *et al.*, 2007). Daunnya digunakan sebagai pakan ternak dan dimanfaatkan sebagai pakan ulat sutera.

Ekstrak daunnya dapat dimanfaatkan sebagai penghasil minyak esensial yang digunakan sebagai bahan dasar parfum (Chaturvedi *et al.*, 2007).

2.1.6 Fitokimia Tanaman Juwet

Tanaman juwet memiliki senyawa kimia yang beragam. Setiap bagian organ memiliki kandungan fitokimia yang berbeda-beda. Fitokimia dari organ tanaman juwet yaitu disajikan pada tabel 2.1(Pradhanan, 2016):

Tabel 2.1. Kandungan kimia pada masing-masing bagian tanaman juwet (*S. cumini*)

No	Bagian Tanaman	Kandungan
1	Daun	Zat glukosida, flavanol, quercetin, myricetin trifenoïd, esterase, karbon, dan tannin
2	Kulit Batang	Asam betulinic, friyedelin, epifriedelanol, β sitosterol, eugenin dan fatty asam ester dari epi-friedelanol, β -sitosterol, quercetin kaempferol, myricetin, asam galie dan asam ellagik, bergenin, flavonoids, dan tanin.
3	Bunga	Zat kaemferol, quercetin, myricetin, isoqueretin, myricetin-3-L-Arabinoside, quercetin-3-D-galactoside, dihydromyricetin, asam-oleanolic, eugenol-triterpenoid A, dan eugenol-triterpenoid B
4	Akar	flavonoid, glycoside dan isorhamnetin3-O-rutinoside
5	Buah	rafinosa, glucose, fructose, asam sitrik, asam mallic, asam gallik, anthocyanin, tannin, delphinidin-3-gentioside, cyanidindicli glycoside, petunidin dan malvidin, favlanoid
6	Biji	glucoside, phenolic, trace pale yellow essential oil, chlorophyll, fat, resin, gallic acid, ferulic acid guaicol, resorcinol, dimethyl ether, corilaginin, protein, calcium, cumminoseide, tanin, favlanoid, histamin, serotonin

2.2 Fungi Endofit

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman yang tidak terpapar udara dan tidak menginduksi penyakit pada tanaman inang. Mikroba ini tidak menimbulkan penyakit, dan bahkan dapat mensintesis sejumlah alkaloid seperti ergopeptida, loline, lolitrem, dan peramine pada saat terjadi fotosintesis pada tanaman inang. Zat tersebut berfungsi sebagai racun dan atau pertahanan terhadap nematoda, serangga, serta mamalia herbivora. Lolitrem

bersifat neurotoksin terhadap mamalia dan dapat mengakibatkan kematian ternak pada padang rumput yang terinfeksi berat oleh endofit (Strobel & Bryn, 2003).

Fungi endofit merupakan salah satu elemen yang paling penting dalam ekosistem yang memiliki pengaruh signifikan terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman inang. Pengetahuan tentang hubungan antara fungi endofit dan tanaman inang belum dieksplorasi secara mendalam. Memahami dan mengeksplorasi hubungan antara fungi endofit dan tanaman inang tersebut dapat memfasilitasi produksi yang ideal kandungan metabolit sekunder tanaman yang lebih baik dengan memanipulasi kondisi pertumbuhan tanaman inang, misalnya, menambahkan kelompok tertentu dari fungi endofit pada tanaman untuk meningkatkan kualitas dan kuantitas obat.

Fungi endofit Ascomycetes berada dalam jaringan internal tanaman di bawah lapisan sel epidermis, di mana fungi endofit ini berada dalam jaringan sehat dan hidup melalui infeksi diam (Bacon, 2000). Ada keanekaragaman hayati yang besar dari fungi endofit terjadi secara alami di daerah beriklim sedang dan hutan hujan tropis, di mana sekitar 300.000 spesies tanaman inang terestrial didistribusikan. Setiap spesies tanaman host memiliki satu atau lebih spesies fungi endofit. Fungi endofit adalah kelompok polifiletik mikroorganisme, dan dapat berkembang asimtotik dalam jaringan sehat dari tanaman yang hidup di atas atau di bawah tanah, termasuk batang, daun, akar, buah dan biji (Faeth and Fagan, 2002).

Beberapa fungi endofit dapat menghasilkan beberapa hormon tanaman yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman inang (Waqas *et al.*, 2012). Beberapa

fungi endofit juga dapat menghasilkan senyawa bioaktif seperti alkaloid, diterpenes, flavonoid, dan isoflavonoid untuk meningkatkan ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik dari tanaman inang mereka (Firakova *et al.*, 2007; Rodriguez *et al.*, 2009).

2.3 Asosiasi Fungi Endofit dengan Tanaman Inang

Fungi endofit merupakan mikroba yang hidup pada jaringan tanaman tanpa menyebabkan sifat patogenitas. Fungi endofit ini hidup berpasangan dengan tanaman inang yang bersifat simbiosis mutualisme. Allah ﷺ berfirman dalam Al-Qur'an surat Yaasin ayat 63:

سُبْحَانَ اللَّهِيْ خَلَقَ الْأَزْوَاجَ كُلُّهَا مِمَّا تُبْتَعِدُ الْأَرْضُ وَمِنْ أَنْفُسِهِمْ وَمِمَّا لَا يَعْلَمُونَ

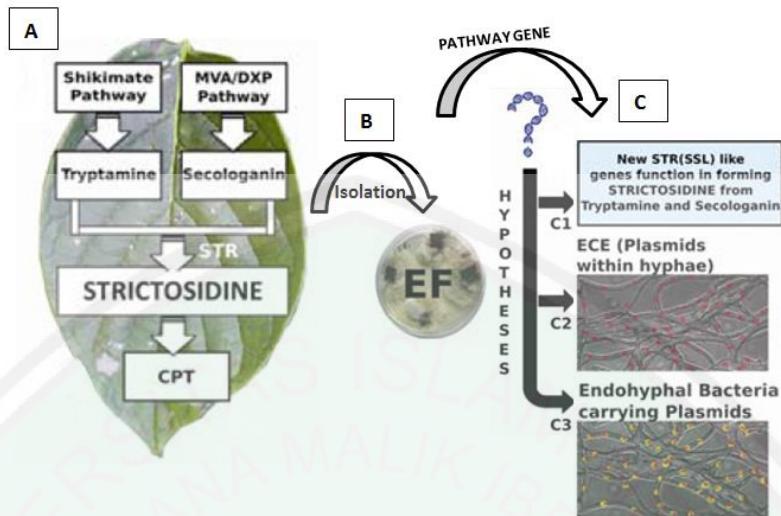
Artinya: “Maha suci Tuhan yang telah menciptakan pasangan-pasangan semuanya, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi dan dari diri mereka maupun dari apa yang tidak mereka ketahui (QS. Yaasin (36):36).”

Menurut menurut Al-Mahalli dan As-Syuthi (2010) pada surat Yaasin(36) ayat 36 menjelaskan “(Maha Suci Allah yang telah menciptakan pasangan-pasangan) yang berjenis-jenis (semuanya, baik dari apa yang ditumbuhkan oleh bumi) berupa biji-bijian dan lain-lainnya (dan dari diri mereka) yaitu jenis pria dan wanita (maupun dari apa yang tidak mereka ketahui) yaitu makhluk-makhluk yang ajaib dan aneh.” Menurut Al-Jazairi (2006) menjelaskan tafsir surat Yaasin 36:63 “pada konteks ini disebutkan tanda-tanda kekuasaan ilmu Allah. Hal ini terlihat dari penciptaan makhluk yang berpasang-pasangan, baik tumbuhan, hewan, atau makhluk yang tidak diketahui.”

Berdasarkan firman Allah ﷺ dan tafsir di atas, dapat diketahui bahwa Allah ﷺ telah menciptakan pasang-pasangan. Pasang-pasangan yang dijelaskan di atas tertuliskan dari makhluk yang diketahui bahkan dari yang tidak diketahui. Di dalam konteks biologi, dapat diambil contohnya berupa pasangan fungi endofit dan tanaman inang. fungi endofit dan tanaman inang adalah pasangan yang memiliki hubungan simbiosis mutualisme saling menguntungkan.

Endofit adalah mikroba yang hidup pada jaringan internal tanaman inang tanpa menyebabkan kerusakan pada tanaman inang (Bacon, 2000). Semua tanaman vaskular memiliki organisme endofitik (Zhang, 2006). Endofit ini melindungi tanaman inang dari agen penyebab infeksi, melindungi dari kondisi buruk dengan mensekresi metabolit sekunder bioaktif (Azevedo *et al.*, 2000; Strobel and Bryn, 2003). Fungi endofitik ini memiliki peran fisiologis yang penting bagi tanaman inang (Malinowaki *et al.*, 2004) dan ekologinya (Tintjer and Rudger, 2006; Malinowski and Belesky, 2006).

Fungi endofit dapat hidup pada jaringan tanaman inang selama periode tertentu. Setiap tanaman tingkat tinggi dapat ditumbuhi beberapa fungi endofit yang membentuk koloni. Fungi endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inang. Hal ini dikarenakan sebagai akibat transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam fungi endofit (Radji, 2005). Hipotesis bagaimana metabolit sekunder pada tanaman inang terdapat pada metabolit sekunder disajikan pada gambar 2.2 (Manjunatha *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 Skema hipotesis mekanisme produksi metabolit sekunder tanaman inang dan *endophytic fungi* (EF). A) Pembentukan strictosidine oleh sintase enzim strictosidine (STR). B) Isolasi *endophytic fungi* (EF) dari tanaman inang. C) Hipotesis *endophytic fungi* memiliki metabolit sekunder dari tanaman inang. C1)

Strictosidine synthase (STR) adalah enzim utama dalam biosintesis alkaloid. Enzim ini mengkatalisis kondensasi *tryptamine* dan membentuk *strictosidine*. Beberapa hipotesis dibuat untuk mengetahui bagaimana fungi endofit dapat memiliki senyawa metabolit sekunder yang sama dengan inang. Pertama, ada kemungkinan bahwa pada fungi terdapat STR lain (*a new STR*) yang memiliki fungsi yang sama dengan STR pada tumbuhan. Kedua, fungi endofit mungkin tidak memiliki gen STR sendiri, tetapi mungkin *extra-chromosomal elements*(ECEs) berpindah dalam sitoplasma jamur. STR diduga ditransfer dari tanaman inang. Ketiga, gen STR dibawa oleh plasmid bakteri endofit. Plasmid mendapatkan gen tersebut berasal dari transfer genetik dari oleh tanaman inang (Manjunatha *et al*, 2013).

Mikroba endofit terdapat pada sebagian besar tanaman, terutama terdiri atas jamur dan bakteri yang hidup interseluler di dalam jaringan tanaman dan hanya

sebagian kecil dari total biomasa tanaman. Jaringan tanaman dapat menjadi inang yang kompleks untuk komunitas mikroba endofit. Umumnya pada jaringan yang sama dapat diisolasi lebih dari satu spesies mikroba endofit (Strobel *et al*, 1996).

Kolonisasi endofit pada jaringan tanaman dapat melalui beberapa mekanisme yaitu spora *airborne* yang terbentuk pada inangnya atau sisa-sisa inang. Endofit yang telah diteliti intensif adalah endofit pada rumput-rumputan. Endofit dapat menyebar secara horizontal dan vertikal. Secara horizontal, penyebaran inokulum terjadi melalui udara (*airborne*) yaitu terbang bersama angin dan jatuh pada permukaan tanaman kemudian tumbuh dan memasuki jaringan tanaman dan berada di antara sel. Penyebaran secara vertikal yaitu endofit yang berada pada tanaman berada pada biji dan menetap, kemudian menyebar dan tumbuh bersama perkecambahan biji dan terus berada pada tanaman keturunannya (Agusta, 2009).

2.4 Identifikasi Fungi Endofit

Identifikasi fungi endofit dapat dilakukan secara morfologi berupa mikroskopis dan makroskopis, selain itu identifikasi fungi endofit dapat dilakukan secara molekuler. Pengidentifikasi fungsi endofit bertujuan untuk memberi nama dari jenis-jenis spesies.

Allah ﷺ berfirman di dalam Alqur'an surat Al-Baqarah (2) ayat 31 yaitu:

وَعَلِمَ إِدَمَ الْأَسْمَاءَ كُلَّهَا ثُمَّ عَرَضَهُمْ عَلَى الْمَلَائِكَةِ فَقَالَ أَنْبِعُونِي بِاسْمَآءَ هَؤُلَاءِ إِنْ كُنْتُمْ صَادِقِينَ

Artinya: "Dan Dia mengajarkan kepada Adam Nama-nama (benda-benda) seluruhnya, kemudian mengemukakannya kepada Para Malaikat lalu berfirman: "Sebutkanlah kepada-Ku nama benda-benda itu jika kamu mesmang benar orang-orang yang benar!" (Q.S Al-Baqarah (2):31).

Menurut Al-Mahalli dan As-Syuthi (2010) pada surat Al-Baqarah ayat 31 menjelaskan kalimat ﴿وَعَلِمَ عَادُم الْأَسْمَاءِ كُلُّهَا﴾ maksudnya “Allah ﷺ mengajarkan nama-nama benda (kesemuanya) dengan jalan memasukkan ke dalam kalbunya pengetahuan tentang benda-benda itu.” Menurut Ali (1989) menjelaskan kata-kata harfiah dalam bahsa arab sepanjang pangkal ayat ini adalah “*Nama-nama segala benda*” yang oleh para mufasir diartikan “*Segala sesuatu serta ciri-cirinya lebih dalam.*” Menurut tafsir Al-Aisar menjelaskan kata ﴿الْأَسْمَاءِ﴾ berarti nama-nama semua jenis makhluk.

Berdasarkan firman Allah ﷺ di atas pada kutipan (*Dan diajarkan-Nya kepada Adam nama-nama*) merupakan suatu ungkapan dari ilmu Allah ﷺ atas pemberian nama-nama suatu benda. Benda yang dimaksud mencangkup makhluk hidup ataupun tak hidup. Salah satu makhluk hidup adalah fungi endofit. Pemberian nama dalam konteks biologi sering disebut identifikasi. Identifikasi dapat dilakukan dengan menggali ciri-ciri lebih dalam dari obyek yang akan diidentifikasi, sehingga proses pengidentifikasiannya pada fungi endofit dapat memberi nama fungi dari yang belum diketahui menjadi diketahui.

2.4.1 Identifikasi Morfologi

Identifikasi secara morfologi merupakan identifikasi dengan melakukan pengamatan karakter fisik pada suatu spesies. Identifikasi secara morfologi pada fungi penting dilakukan karena dapat mengidentifikasi spesies sampai tingkatan genus, namun untuk mengetahui sampai tingkatan spesies diperlukan data sifat fisiologi ataupun biokiminya (Gandjar, 1999).

2.4.1.1 Identifikasi secara Makroskopis

Menurut Kurtzman (2003) memaparkan sebagian besar identifikasi fungi secara makroskopis dilakukan secara konvensional. Pengamatan secara konvensional ini diantaranya; warna fungi, ukuran koloni, bentuk, tepi koloni, perubahan dari usia muda ke tua.

Pertumbuhan koloni fungi endofit sebaiknya diikuti dari awal ditanam hingga saat akan dibuat preparat mikroskop. Semua perubahan harus dicatat. Beberapa hal yang harus diperhatikan pada awal mempelajari fungi yang sudah ditanam pada medium adalah (Gandjar *et a*, 1999):

1. Medium yang digunakan, suhu inkubasi, umur pada waktu deskripsi dibuat.
2. Morfologi (halus, kasar, licin, rata, menggunung, ada atau tidak tetes-tetes eksudat) dan warna koloni.
3. Warna sebalik koloni (*reverse slide*).
4. Garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni, ada atau tidak.
5. Lingkaran-lingkaran konsentris ada atau tidak.

2.4.1.2 Identifikasi secara Mikroskopis

Menurut Yarrow (1998) menjelaskan penampakan mikroskopik juga dapat digunakan untuk identifikasi kapang diantara bentuk sel, kisaran ukuran sel, tipe pertunasan, keberadaan miselium palsu maupun sejati, dan tipe reproduksi seksual atau aseksual.

Beberapa hal yang dapat diamati saat identifikasi secara mikroskopis adalah (Gandjar *et al*, 1999):

1. Hifa berseptum atau tidak.
2. Hifa berpigmentasi hialain (tak berwarna, atau biru bila diberi cat) atau gelap (dematiaceous – coklat kehijauan atau kehitaman, hitam kelam, hitam ke abu-abuan).
3. Hifa berbentuk seperti spiral, atau bernodul, atau mempunyai rhizoid.
4. Spora aseksual berbentuk sederhana seperti arthospora, blastospora, khlamidospora (interkalar atau terminal), atau sporangiospora.
5. Spora aseksual berbentuk lebih khusus, seperti konida atau aleurospora yang dibentuk pada hifa khusus yang disebut konidiofor. Diamati bentuk, ukuran, jumlah, bersel banyak atau tidak, dan pengaturan letaknya: (a) bentuk ganda, (b) bentuk gelondong, (c) bentuk bulan sabit, (d) bentuk bulat atau semi bulat, (e) bentuk tidak teratur, (f) bentuk silindris, (g) bentuk elips, (h) bentuk seperti bitang, (i) bentuk seperti benang.
6. Ukuran spora aseksual: (a) besar (20 – 100 nm), atau (b) kecil (1 – 5 cm).
7. Pengaturan spora aseksual: (a) diproduksi tunggal, (b) diproduksi berantai (rantai yang bercabang atau rantai tidak bercabang), (c) berbentuk klaster (berkelompok).
8. Spora seksual memiliki bentuk yang bervariasi seperti askospora, basidiospora, dan zigospora.
9. Sel : (a) bersel tunggal (berdinding halus, atau kasar, berpigmen atau tidak), (b) bersel banyak (berdinding halus atau kasar, bersepta atau tidak, bersepta hanya transversal, atau transversal dan longitudinal, berpigmen atau tidak).

2.4.2 Identifikasi secara Molekuler

Allah ﷺ berfirman di dalam Al-Qur'an surat Al-Hijr ayat 19:

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَقْيَنَا فِيهَا رَوَسِيَّا وَأَنْبَتَنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَوْزُونٍ ﴿١٩﴾

Artinya: “*Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran(QS. Al-Hijr/15:19).*”

Kalimat وَأَنْبَتَنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَوْزُونٍ pada surat AL-Hijr (15) ayat 19 menurut menurut Al-Mahalli dan As-Syuthi (2010) memiliki makna “(*dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran) maksudnya yang telah ditentukan secara pasti.*” Menurut tafsir Ath-Thabari (2009) memiliki makna “*Kami tumbuhkan di bumi segala sesuatu yang terukur serta dengan batasan yang diketahui.*” Menurut tafsir Ali (1989) memiliki makna “*segala yang diciptakan di bumi sudah menurut perimbangan dan ukuran yang serasi.*”

Berdasarkan Firman Allah ﷺ dan beberapa tafsir di atas, dapat diketahui bahwa Allah telah menumbuhkan sesuatu sesuai ukuran dengan pasti. Secara ilmu biologis, hal ini dapat diketahui dari rDNA fungi. Susunan dan ukuran rDNA fungi ini dapat membedakan antar spesies fungi, sehingga keanekaragaman dapat teridentifikasi secara akurat.

Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah penyimpan utama dari informasi genetik. Informasi genetik disalin dan dipindah pada molekul RNA, sekuen nukleotida yang mengandung kode untuk sekuen asam amino yang khas. Protein kemudian disintesis dalam suatu proses translasi dari RNA. DNA

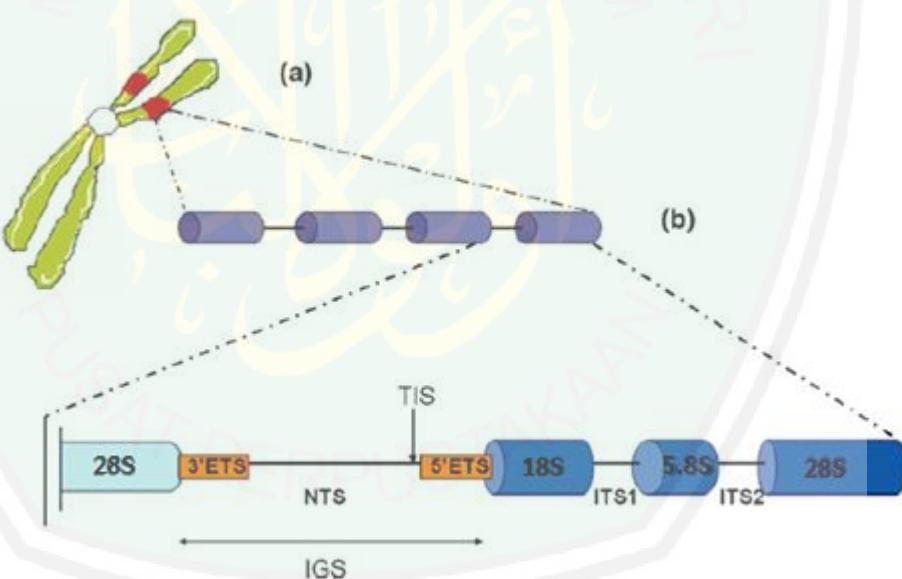
pada organisme tinggi (manusia, hewan, dan tumbuhan) terdapat di dalam inti sel dan beberapa organel lain seperti mitokondria dan kloroplas. (Nicholas, 1993).

Perkembangan identifikasi mikroba diawali dengan identifikasi melalui ciri-ciri morfologi, fisiologi, dan metabolisme. Namun adanya kekurangan-kekurangan metode ini yaitu berupa ketidakakuratan dan waktu identifikasi yang lama menjadikan metode secara molekuler lebih berkembang. Tahapan identifikasi dengan metode molekuler meliputi ekstraksi *deoxyribonucleic acid* (DNA), amplifikasi DNA, sekvensing, analisis hasil sekuen, dan pembuatan pohon filogenetik. Salah satu analisis molekuler adalah menggunakan sekuen DNA ribosomal (rDNA) pada daerah *Internal Transcribe Spacer* (ITS).

Sekuensing ribosomal DNA dapat digunakan untuk analisis filogenetik. Analisis ini digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antar spesies. Hasil analisis membantu dalam memberikan informasi kemungkinan kesamaan metabolit sekunder yang dihasilkan dengan spesies lainnya.

Salah satu karakter molekuler yang dapat digunakan adalah genom nuklear. Bagian Genom nuklear atau inti yang sering digunakan untuk menyimpulkan suatu filogenetik adalah DNA ribosomal yang disebut rDNA. rDNA adalah daerah genom inti pengkode RNA ribosomal (Osterbauer, 2002). Ribosomal DNA adalah daerah dalam nuklear DNA yang mengkode ribosom. Ribosom adalah organel sel yang berperan dalam sintesis protein dan terdiri dari subunit kecil (18S) dan subunit besar (28S). Subunit rDNA

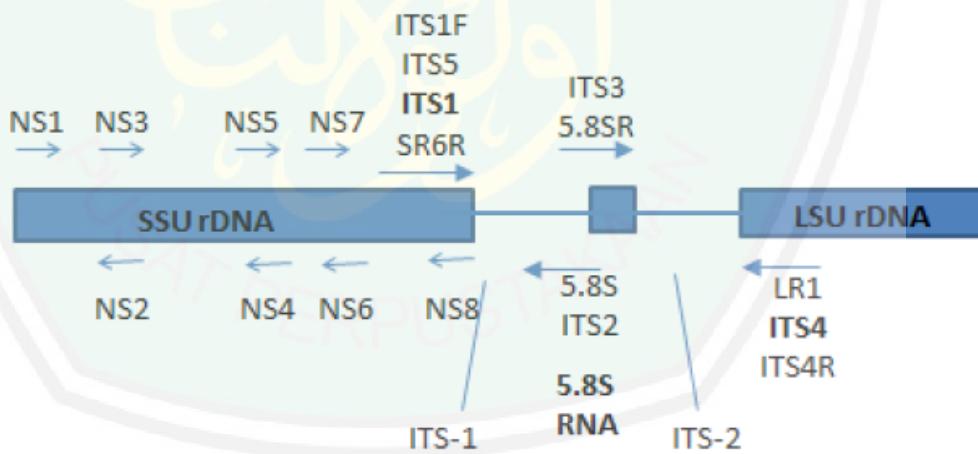
baik yang besar maupun yang kecil dipisahkan oleh ETS (*external transcribed spacer*) dan IGS (*intergenic spacer*). Kedua pembatas tersebut kadang-kadang disebut NTS (*nontranscribed spacer*). Urutan nukleotida rDNA berisi dua daerah *non-coding* (ITS1 dan ITS2) dan gen 5,8S rDNA (Gambar 2.3). Urutan nukleotida pada gen 5,8S rDNA sangat *conserved*, tetapi dua daerah ITS lainnya tidak ditranslasi menjadi protein dan sangat bervariasi. pada rDNA fungi terdapat daerah konservatif yaitu gen penyandi rRNA 18S, 5.8S dan 28S yang di antaranya terdapat daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Articus, 2004).



Gambar 2.3 Skema struktur universal wilayah rDNA (a)Kromosom lokasi wilayah rDNA. (b) Tandem array (18S - 5.8S - 26S). Dalam array tandem setiap blok gen dipisahkan oleh *Intergenic spacer* (IGS) yang terdiri dari 5' dan 3'berakhir di *External Transcribed Spacer* (ETS)). Dua daerah ETS dipisahkan oleh daerah *nontranscribed* (NTS). Transkripsi awal situs (TIS) berada pada posisi awal 5' ETS. *Small Subunit* (18S) dan gen *Large subunit* (5.8S dan 28S) dipisahkan *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS1) dan *Internal Transcribed Spacer 2* (ITS2)(Poczai & Hyvonen, 2010).

Daerah DNA pengkode yang sangat terkonservasi (18S, 28S rDNA) merupakan daerah evolusi utama yang sering digunakan sebagai pembanding tingkat spesies dan genus terkait. Setiap unit rDNA dalam satu rangkaian kromosom memiliki daerah pengkode yaitu 18S, 5.8S, dan 28S yang mengapit ITS1 dan ITS2 (Soltis & Soltis 1998). Gen 18S rDNA, berikut dua daerah ITS dan gen 5.8S rDNA memiliki panjang total 2600 bp, terpisah dari gen 28S rDNA yang memiliki panjang 3300 bp (McCulloug, 1998).

Daerah rDNA memiliki beberapa primer yang digunakan untuk proses amplifikasi. Diantaranya SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, dan LSU rDNA (Gambar 2.4) (Fajarningsih, 2016):



Gambar 2.4 Diagram lokasi primer dalam ribosom yang terdiri dari SSU, ITS1, 5.8S, ITS2, dan LSU rDNA

Wilayah ITS terdiri dari tiga bagian yaitu ITS1 dan ITS2 dan daerah sangat *conserved* 5.8S. Daerah-daerah tersebut memiliki primer-primer gen yang tersaji pada Tabel 2.2 (White *et al*, 1990):

Tabel 2.2 Sequens primer daerah ITS dan suhu anealing

Gene Primer	Primer Sequence	Tm (°C)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	65
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	62
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	62
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	63
ITS1-F	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA	55
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG	67

Daerah *internal transcribed spacers* (ITS) merupakan daerah sekuen DNA yang tidak menyandikan protein fungsional dan berada di daerah RNA ribosom (rRNA). Daerah ini dapat digunakan sebagai penanda genetika karena memiliki variasi sekuen yang cukup tinggi bahkan dalam spesies yang sama, dan semua fungi memiliki ITS rDNA. Oleh karena itu, ITS banyak digunakan untuk analisis filogenetik, proses evolusi, dan penentuan identitas taksonomi (Purnamasari, 2012). Menurut Soltis & Soltis (1998) ITS pada daerah 18S-28S rDNA nuklear menjadi fokus utama untuk digunakan pada rekonstruksi filogenetik. Hal ini dikarenakan daerah ITS memiliki tingkat variasi yang tinggi dibandingkan dengan daerah lainnya pada rDNA subunit kecil dan subunit besar.

2.5 Filogenetik

Filogenetika adalah suatu ilmu yang mengkombinasikan teknik biologi molekuler dengan ilmu statistik untuk membuat rekonstruksi filogenetika (Hidayat dan Adi, 2006). Analis filogenetika berhubungan dengan evolusi biologi. Evolusi memungkinkan terjadinya perubahan suatu organisme sederhana menjadi

organisme kompleks melalui akumulasi perubahan dari generasi ke generasi. Keturunan akan memiliki perubahan dari nenek moyangnya karena sedang terjadinya proses evolusi (Estarbrook, 1984).

Analisis sistematis dilakukan melalui konstruksi sejarah evolusi dan hubungan evolusi antara keturunan dengan nenek moyangnya berdasarkan pada kemiripan karakter sebagai dasar dari perbandingan (Lipscomb, 1998). Jenis analisis yang diketahui baik adalah analisis filogenetika atau *cladistics* (kelompok keturunan dari satu nenek moyang yang sama). Analisis filogenetik direpresentasikan sebagai sistem percabangan misalnya diagram pohon (pohon filogenetika) (Brinkman dan Leipe, 2001). Pohon filogenetik merupakan pendekatan yang menunjukkan hubungan evolusi antar organisme (Schmidt, 2003).

Dalam sistem biologis, proses evolusi melibatkan mutasi genetik dan proses rekombinan dalam spesies untuk membentuk spesies yang baru. Sejarah evolusi organisme dapat diidentifikasi dari perubahan karakternya. Karakter yang sama adalah dasar untuk menganalisis hubungan satu spesies dengan spesies lainnya (Schmidt, 2003).

2.5.1 Hubungan analisis filogenetika dengan *alignment*/penjejeran sekuen

Ketika sekuen nukleotida atau protein dari dua organisme yang berbeda memiliki kemiripan, maka mereka diduga diturunkan dari sekuen *common ancestor*. Sekuen penjejeran akan menunjukkan dimana posisi sekuen adalah tidak berubah/*conserved* dan dimana merupakan *divergent*/atau berkembang menjadi berbeda dari *common ancestor* seperti diilustrasikan Mount (2001) pada gambar

2.5. Sekuen 1 dan 2 diasumsikan berasal dari nenek moyang yang sama (*common ancestor*). Total terdapat dua sekuen yang berubah.



Gambar 2.5 Sekuen 1 dan 2 diasumsikan berasal dari nenek moyang yang sama (*common ancestor*)

Studi sekuen biologi selalu tidak dapat dihindarkan dari penjejeran sekuen/*alignment*. Tujuan dari proses penjejeran adalah mencocokkan karakter-karakter yang homolog, yaitu karakter yang mempunyai nenek moyang yang sama (Kemena dan Notredame, 2009). Ketika menghomologikan sekuen, kolom dari penjejeran dapat digunakan untuk berbagai macam aplikasi seperti mengidentifikasi residu dengan struktur yang *analog* atau yang mempunyai fungsi yang serupa atau untuk mengkonstruksi pohon filogenetika. Akurasi dari program penejejeran sekuen yang lebih dari dua set/*multiple sequence alignment* telah dihasilkan oleh berbagai macam studi komperatif (Blackshields *et al.*, 2006; Edgar dan Batzoglou, 2006; Notredame, 2007).

Metode paling umum dalam melakukan *multiple sequence alignment* adalah pertama melakukan penjejeran kelompok sekuen yang mempunyai hubungan dekat dan kemudian secara sekuensial ditambahkan sekuen yang berhubungan namun lebih berbeda. Penjejeran yang diperoleh diakibatkan karena sebagian besar sekuen yang mirip dalam kelompok sehingga tidak merepresentasikan sejarah yang sesungguhnya dari perubahan evolusi yang telah terjadi. Sebagian

besar metode analisis filogenetika mengasumsikan bahwa masing-masing posisi sekuen protein atau asam nukleat yang berubah secara independen satu sama yang lain (kecuali evolusi sekuen RNA) (Hidayat dan Adi, 2006).

Analisis sekuen yang sangat mirip dan mempunyai panjang yang sama adalah sangat jelas. Seringkali hasil penjejeran sekuen memperlihatkan adanya *gap* dalam penjejeran tersebut. *Gap* menunjukkan adanya insersi atau delesi dari satu atau lebih dari karakter sekuen selama evolusi(Hidayat dan Adi, 2006).

Gap dalam penjejeran merepresentasikan perubahan mutasi dalam sekuen termasuk insersi, delesi atau penyusunan ulang materi genetik. Ekspektasi bahwa panjang *gap* dapat terjadi sebagai akibat adanya introduksi tunggal yang memutuskan berapa banyak perubahan individu telah terjadi dan apa perintahnya. *Gap* diberi perlakuan (*treated*) dalam beberapa program filogenetik, tetapi tidak ada *clear-cut model* seperti bagaimana seharusnya mereka di perlakukan. Beberapa metode mengabaikan *gap* yang terjadi atau hanya memfokuskan dalam penjejeran yang tidak mempunyai *gap*. Meskipun *gap* dapat berguna sebagai petanda filogenetik di beberapa situasi (Hidayat dan Adi, 2006).

Pendekatan lainnya untuk menangani *gap* adalah mencegah analisis situs individu dalam penjejeran sekuen, dan menggantikan dengan menggunakan skoring kemiripan/*similarity score* sebagai dasar dari analisis filogenetika (Hidayat dan Adi, 2006).

Dalam mengkonstruksi pohon filogenetika dapat diklasifikasikan menjadi 2 kategori yang digunakan sebagai strategi untuk menghasilkan pohon filogenetika terbaik. Kategori pertama adalah memeriksa semua atau sejumlah besar

kemungkinan pohon filogenetika dan memilih satu yang terbaik dengan kriteria-kriteria tertentu. Biasanya disebut dengan metode *exhaustivesearch*. Metode *maximum parsimony*, *Fitch Margoliash* dan *maximum likelihood* termasuk dalam kategori ini. Kategori yang kedua adalah memeriksa hubungan topologi lokal dari pohon dan mengkonstruksi pohon terbaik dengan langkah demi langkah. Metode *Neighbor-joining* dan beberapa metode *Distance* lainnya adalah termasuk dalam kategori yang kedua ini (Saitou dan Imanishi, 1989).

2.5.2 Metode *Neighbor Joining*

Metode *neighbor-joining* sangat mirip dengan metode Fitch dan Margoliash kecuali tentang pemilihan sekuen untuk berpasangan ditentukan oleh perbedaan algoritma. Metode *neighbor-joining* sangat cocok ketika rata-rata evolusi dari pemisahan *lineage* adalah di bawah pertimbangan yang berbeda-beda. Ketika panjang cabang dari pohon yang diketahui topologinya berubah dengan cara menstimulasi tingkat yang bervariasi dari perubahan evolusi, metode *neighborjoining* adalah yang paling cocok untuk memprediksi pohon dengan benar (Saitou dan Mei, 1987). *Neighbor-joining* memilih sekuen yang jika digabungkan akan memberikan estimasi terbaik dari panjang cabang yang paling dekat merefleksikan jarak yang nyata diantara sekuen (Dharmayanti, 2011).

2.5.3 Metode *Bootstrap*

Dalam metode *bootstrap*, data dilakukan *resampled*, dengan secara random memilih kolom vertikal dari sekuen yang dijejerkan untuk menghasilkan penjejeran, dan dalam pengaruh sebuah penjejeran baru dengan panjang yang sama. Masing-masing kolom digunakan lebih dari satu kali dan beberapa kolom

mungkin tidak digunakan pada semua penjejeran yang baru. Pohon-pohon kemudian diprediksi dari beberapa penjejeran ini dari *resampled* sekuen (Felsenstein, 1988). Untuk cabang-cabang dalam topologi filogenetika yang diprediksi menjadi signifikan jika set data *resampled* seharusnya berulangkali (sebagai contoh > 70%) memprediksi cabang-cabang yang sama (Dharmayanti, 2011).

Analisis *bootstrap* adalah metode yang menguji seberapa baik set data model. Sebagai contoh validitas penyusunan cabang dalam prediksi pohon filogenetik dapat diuji dengan *resampled* dari kolom dalam *multiple sequence alignment* untuk membentuk beberapa penjejeran baru. Penampakan cabang dalam pohon dari sekuen *resampled* ini dapat diukur. Alternatifnya, sekuen kemungkinan harus dikeluarkan dari analisis untuk menentukan berapa banyak sekuen yang mempengaruhi hasil dari analisis. *Bootstrap analysis* didukung oleh sebagian besar paket software menguji cabang-cabang yang dapat dipercaya(Dharmayanti, 2011).

Untuk memperkecil kesalahan dalam mengkonstruksi pohon filogenetika dapat dilakukan sampling ulang dengan petanda genetik lain pada sampel yang sama dan kemudian membandingkan kedua bentuk pohon tersebut. Akan tetapi tindakan tersebut membutuhkan biaya besar sehingga hampir tidak mungkin dilakukan. Sebagai gantinya Efron (1979) memperkenalkan metode sampling ulang (*resampling*) dari data yang telah ada yang dikenal dengan analisis *bootstrap* untuk menguji validitas konstruksi pohon filogenetika (Dharmayanti, 2011). *Bootstrap* digunakan untuk mengevaluasi kestabilan cabang. Nilai

bootstrap dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan cabang. Pada pohon filogenetikan nilai *bootstrap* dikatakan stabil jika *bootstrap* nilai *bootstrap* ($>90\%$), sedangkan nilai *bootstrap* dikatakan rendak jika ($<70\%$) pada (Osawa *et al* 2004).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif eksploratif kualitatif, yaitu mengidentifikasi isolat fungi endofit dari buah dan biji *Syzygium cumini* (L.) Skeels yang diperoleh dari Desa Bantur- Kabupaten Malang secara morfologi dan molekuler pada sekuen rDNA daerah ITS.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Mei 2018. Isolasi fungi endofit buah dan biji *Syzygium cumini* (L.) Skeels bertempat di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Adapun tempat isolasi DNA hasil isolasi fungi endofit buah dan biji *Syzygium cumini* (L.) Skeels berada di Laboratorium Genetika dan Riset Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Tahap sekuensing dilakukan dengan mengirim sampel ke 1st BASE DNA Sequencing Services Singapura.

3.3 Alat dan Bahan Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah jarum ose, *Laminar Air Flow*, *shaker inkubator*, cawan petri, *autoclave*, api bunsen, pimes, erlenmeyer, hot plate, My CyclerTM Cycler BIO-RAD, mortal steril, waterbath, ultrasentrifugase, tube 1.5 mL. Tube PCR, Thermo Cycler, mikropipet, tip, vortex, sentrifugator, nanodrops AE-Nano200 Nucleid Acid Abalyzer versie 2.0, Gel DocTM XR Imaging System BIO-RAD, Thermo

Scientific Heraeus Pico 17 Centrifuge, freezer, water pass, neraca analitik, sisir, cetakan gel, elektroforesis vertikal.

3.3.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah dan biji *Syzygium cumini* (L.), PDA (*Potato Dextrose Agar*), PDB (*Potato Dextrose Broth*), antibiotik *streptomycin*, NaOCl 53%, aquades, alkohol, agarose, TBE 1x. Loading dye, PCR MIX, Primer ITS-1 dan ITS-4, bufer 2x CTAB {100 mM Tris-HCL (pH 8), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 2% PVP, 0.2% β-mercaptoethanol} (*lampiran 1*), parafilm, *chloroform*, *isoamylalcohol*, *amonium asetat*, agarose, TBE 10x, *ethidium bromida*, NaCl, alkohol, *ethanol 70%*, *ethanol absolute*.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dilakukan dengan cara membungkus alat-alat gelas dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik. Sterilisasi bahan berupa media PDA dan PDB dilakukan dengan ditutup mulut wadah dengan kapas dan kasa kemudian dimasukkan ke dalam plastik. Alat dan bahan di sterilisasi pada *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C.

3.4.2 Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dan media PDB (*Potato Dextrose Broth*). Media PDA dan PDB digunakan untuk isolasi dan pemurnian fungi endofit. Pembuatan media PDA dilakukan dengan menghomogenkan 39 g media PDA dalam 1000 mL

aquades. Pada media PDB dilakukan dengan menghomogenkan 29 g media PDB dalam 1000 mL aquades. PDA dan PDB yang telah homogen disterilisasi pada *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C. Selanjutnya media dikeluarkan dari *autoclave* dan ditunggu sampai suhu tidak terlalu panas kemudian ditambahkan streptomisin (200 mg/L⁻¹). Media PDA dituangkan pada cawan petri steril, sedangkan media PDB dituang pada erlenmeyer steril. Media disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.3 Isolasi Fungi Endofit

3.4.3.1 Isolasi Fungi Endofit pada Buah

Metode isolasi fungi endofit pada buah menggunakan metode langsung (*direct inoculation*) (Ma, 2014). Isolasi fungi endofit dari buah dilakukan dengan cara diambil buah juwet dari pohonnya langsung. Selanjutnya dipotong bagian buah bentuk dadu dengan ukuran ± 1cm. Hasil potongan dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Selanjutnya proses sterilisasi permukaan buah dilakukan dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Potongan buah direndam dalam Alkohol 70% selama 2 menit. Potongan buah direndam pada aquades steril selama 1 menit (Diulang 2 kali). Selanjutnya dierendam dalam NaOCl 53% selama 5 menit. Dibilas dengan aquades steril selama 1 menit (diulang 2 kali). Hasil bilasan aquades steril diambil 0,1 mL dan dituang ke dalam cwan petri berisi media PDA untuk dijadikan kontrol.

Hasil potongan dikeringkan dalam tisu steril. Selanjutnya potongan buah di letakkan pada media PDA. Dibelah bagian tengah buah. Bagian

belahan diletakkan menempel pada media PDA. Tiap cawan petri berisi 3 potongan buah dan dilakukan duplo. Diinkubasi selama 3 – 7 hari.

3.4.3.2 Isolasi Fungi Endofit pada Biji

Metode isolasi fungi endofit pada biji menggunakan metode Pengenceran cawan tuang (Safitri, 2013). Biji juwet dipisahkan dari buahnya, ditimbang hingga mencapai 25 g. Biji dicuci dengan air mengalir selama 10 menit. Selanjutnya proses sterilisasi permukaan biji dilakukan dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Potongan biji direndam dalam Alkohol 70% selama 2 menit. Potongan biji direndam pada aquades steril selama 1 menit (Diulang 2 kali). Selanjutnya dierendam dalam NaOCl 53% selama 5 menit. Dibilas dengan aquades steril selama 1 menit (diulang 2 kali). Hasil bilasan aquades steril diambil 0,1 mL dan dituang ke dalam cwan petri berisi media PDA untuk dijadikan kontrol.

Hasil biji yang telah disterilisasi permukaan selanjutnya digerus dalam mortal dan alu yang telah disterilisasi. Proses penggerusan dilakukan di dalam LAF. Hasil gerusan biji 25 g dimasukkan dalam 225 mL media PDB kemudian *dishaker* selama 72 jam pada suhu ruang. Setelah *dishaker*, diambil 0,3 mL pada larutan PDB dengan mikropipet (tube steril) dan dituang pada media PDA. Diinkubasi pada suhu ruang 3 – 7 hari. Selanjutnya dilakukan tahap pemurnian.

3.4.4 Pemurnian Fungi Endofit

Fungi endofit hasil isolasi yang telah tumbuh pada media PDA dilakukan tahap pemurnian. Fungi endofit dari buah dan biji dimurnikan berdasarkan perbedaan karakter makroskopis berupa warna, bentuk, tepi dari fungi endofit. Fungi endofit yang dimurnikan dipindah pada media PDA baru. Jika pada proses pemurnian fungi endofit masih bercampur dengan fungi lain, maka dilakukan purifikasi ulang sampai ditemukan fungi endofit murni. Setiap pemurnian dilakukan secara duplo sebagai kultur stok dan kultur penelitian. Fungi diinkubasi pada suhu ruang 3 – 7 hari (Noverita, 2009).

3.4.5 Identifikasi Isolat Fungi Endofit

Identifikasi fungi endofit bertujuan untuk mengetahui karakteristik fungi endofit sehingga dapat diketahui jenis dari fungi endofit. Identifikasi fungi endofit ini terdiri dari dua tahap yaitu identifikasi morfologi makroskopis, mikroskopis, dan molekuler.

3.4.5.1 Identifikasi Morfologi

1. Identifikasi Makroskopis

Menurut Kurtzman (2003) sebagian besar fungi dideskripsikan secara konvensional berdasarkan karakter morfologinya. Salah satu karakter morfologi yang digunakan adalah identifikasi fungi berupa penampakan makroskopik koloni. Menurut Gandjar (1999), dalam melakukan pengamatan morfologi koloni, dapat dilihat dari warna permukaan koloni, selain itu dilihat ada tidaknya garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni dan juga ada tidaknya lingkaran–lingkaran konsentris.

Pengamatan mikroskopis dengan cara melihat hifa (berseptum atau tidak), warna hifa, bentuk hifa, bentuk konidia, dan ukuran spora. Hasil pengamatan digunakan untuk identifikasi berdasarkan panduan buku identifikasi *Illustrated Genere of Imperfect Fungi fourthed* (Barnet and Hunter, 2000), dan literatur pendukung lainnya.

2. Identifikasi Mikroskopis

Identifikasi mikroskopis menggunakan metode *slide culture* James (1986) dengan modifikasi . Dipotong media PDA yang telah padat dari cawan petri ukuran 0.5 cm x 0.5 cm (potongan *block agar*). Diletakkan potongan pada obyek glass steril yang dilapisi tisue steril dalam cawan. Diinokulasikan isolat fungi endofit pada empat sisi blok agar kemudian ditutup dengan *deck glass*. Ditutup rapat cawan petri. Selanjutnya diinkubasi 20 - 25 °C selama 5-7 hari. Setelah masa inkubasi, diangkat *deck glass* secara hati-hati dan dipindahkan di atas objek glass yang telah ditetesi pewarna *Lactophenol Cotton Blue*. Diamati preparat di bawah mikroskop. Identifikasi fungi endofit menggunakan literatur *Illustrated Genera of Imperfecti Fungi* karangan Barnett (2000), buku literatur *Pictoral Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species 2th Edition* karangan Watanabe (2002).

3.4.5.2 Identifikasi Molekuler

1. Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan metode CTAB oleh Doyle & Doyle (1987) dengan modifikasi (*lampiran 2*). Isolasi DNA dimulai dengan

diambil miselium fungi endofit yang berumur 7 hari sebanyak 100 mg. Selanjurnya miselium digerus dalam mortal steril dingin. Dipindahkan hasil gerusan pada tube 2 mL. Ditambahkan 1000 μ l bufer 2X CTAB dan divortex. Selanjutnya diinkubasi di dalam waterbath 65°C selama 60 menit. selanjutnya ditambah 900 μ l (24:1) *chloroform:isoamilalkohol*. Diinkubasi di suhu ruang selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit. Diambil supernatant, Dipindah supernatant pada tube 1.5 mL. Selanjutnya ditambah 1x volume *chloroform:isoamilalkohol* (24:1). Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit. Diambil supernatant dan dipindah pada tube 1.5 mL. Ditambah isopropanol sebanyak $\frac{2}{3}$ volume supernatant. Didiamkan 1 malam pada suhu -4°C. Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit. Dibuang supernatant, dan dicuci pellet dengan 500 μ l *ethanol absolute*. Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 5 menit dibuang supernatant, dan dikering anginkan di oven 25°C. Ditambahkan 50 μ l TE Buffer. Disimpan pada suhu -4°C.

2. Uji Kualitas DNA

Kualitas DNA divalidasi menggunakan 1% (v/v) elektroforesis gel agarosa. Langkah awal elektroforesis yaitu menyiapkan tray/cetakan gel untuk membuat gel elektroforesis. Gel agarosa dibuat dengan konsentrasi 1% dalam 40 mL buffer TBE 1X. Pembuatan gel agarosa 1% dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,4 gr bubuk agarosa dan dilarutkan dalam 40 mL bufer TBE 1X. Gel agarosa dididihkan dengan microwave sampai

agar larut dan berwarna bening. Gel agarosa yang sudah hangat-hangat kuku ditambahkan 2 μL EtBr kemudian dituangkan ke dalam cetakan yang dilengkapi dengan sisir (*comb*) tempat aplikasi sampel. Selanjutnya gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Gel dan cetakannya kemudian direndam pada buffer TBE 1X pada kolom elektroforesis. Sampel hasil isolasi dimasukan dalam sumuran sebanyak 3 μL dan *loading dye* sebanyak 1 μL (3:1). Setelah sampel dimasukkan, sampel kemudian dielektroforesis pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Gel hasil elektroforesis diamati dengan Gel DocTM XR Imaging System BIO-RAD.

3. Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas DNA genom menggunakan nanodrops AE-Nano200 Nucleid Acid Analyzer versie 2.0. Langkah pertama diletakkan blank pada tempat sampel nanodrop. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan nilai absorbansi pada panjang gelombang (260 nm dan 280 nm) dan (260 nm dan 230 nm). Uji kemurnian DNA genom dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm ($\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$) dan rasio absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 230 nm ($\text{A}_{260}/\text{A}_{230}$).

Nilai kemurnian DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dan fenol dalam larutan. Molekul DNA dikatakan murni jika $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ tersebut berkisar antara 1,8 - 2,0 dan rasio absorbansi $\text{A}_{260}/\text{A}_{230}$ berkisar 2.0-2.2. Jika nilai rasio $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ lebih kecil dari 1,8 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa fenol

dan pelarut yang digunakan terlalu banyak. Sedangkan jika nilai rasio $\text{A}260/\text{A}280$ lebih dari 2,0 maka isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan berupa protein dan senyawa lainnya (Sambrook dan Russell, 2001).

4. Amplifikasi DNA

Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer ITS rDNA yaitu ITS1 dan ITS4 (Tabel 3.1) (White, 1990) :

Tabel 3.1 Sekuens Primer

Primer	Gen Primer
ITS 1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Amplifikasi gen ITS pada penelitian ini menggunakan kit maxime PCR PreMix kit (i-StarTaq). Total volume dalam PCR adalah sebesar 25 μL dengan uraian komposisi (Tabel 3.2) (Geisen *et al*, 2017):

Tabel 3.2 Komposisi bahan dan volum amplifikasi DNA

Bahan	Jumlah
DNA Template	1
Primer ITS1 (<i>Forward</i>)	1
Primer ITS 4 (<i>Reverse</i>)	1
PCR mix (dNTPs (2.5 mM, 10x bufer PCR, 2.5 <i>Taq DNA polymerase</i>	7
Aquabides	15

PCR dilakukan dengan menggunakan My CyclerTM Cycler BIO-RAD Thermo Cycler mengikuti prosedur standar (Tabel 3.3) (Chowdhary & Nutan, 2015):

Tabel 3.3 Prosedur PCR

Tahap	Suhu	Waktu	Siklus
Pra-denaturasi	95	15'	1x
Denaturasi	95	1'	35x
Aneling	56	30''	35x
Ekstensi	72	1'	35x
Final Ekstensi	72	10"	1x

Kemudian, produk PCR ini dianalisis pada elektroforesis menggunakan 1% (v / v) gel agarosa yang dijalankan pada 100 volt, 400 mA selama 30 menit. gel diwarnai dengan etidium bromida dan band divisualisasi pada Gel Doc™ XR Imaging System BIO-RAD.

5. Sekuensing DNA

Purifikasi amplikon dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia, sedangkan *cycle sequencing* dan pengumpulan data sekuen dilakukan di 1st BASE DNA Sequencing Services Singapura.

3.4. Analisis Data

Data hasil sekuensing selanjutnya dibaca dengan Sequence Scanner 1.0. Kecocokan ITS dengan Query yang diperoleh dari *Gene Bank* diketahui dengan program BLAST pada NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Perubahan basa nukleotida yang terjadi dilihat dengan program bioedit version 7.2.5. Analisis contig DNA dengan menggunakan program BioEdit version 7.2.5 untuk memperoleh sekvens parsial gen ITS yang utuh (Hall, 1999). Selanjutnya data hasil contig dianalisis dengan cara menyejajarkan sekvens isolat yang diperoleh dengan fungi pembanding fungi endofit yang diperoleh dari *GenBank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Kemudian sekvens disejajarkan dengan

program ClustalX, dengan memilih *output* berupa file dengan format *Clustal*, *FASTA*, dan *Phydit* (.aln, .FASTA, dan .gde)(Thompson, 1997).

File .FASTA hasil penyejajaran dengan ClustalX di import ke dalam program MEGA 5.0 untuk mencari model substitusi terbaik (*best-fit substitution model*) untuk analisis pohon filogenetik. Setelah didapatkan model substitusi terbaik, selanjutnya dibuat pohon filogenetik dengan menggunakan metode algoritma *Neighbor Joining* (NJ) dengan 1000 *Bootsrap* berdasarkan *p-distance*.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolat Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (*Syzygium cumini* L.)

Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi

Fungi endofit berhasil diisolasi dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels. Berdasarkan hasil pemurnian, didapatkan 2 jenis fungi endofit dari buah juwet, dan 3 jenis fungi endofit dari biji juwet (tabel 4.1).

Tabel 4.1 Hasil Isolasi Fungi Endofit dari organ buah dan biji juwet

Kode Isolat Fungi	Bagian Tanaman	Total Isolat
F1	Buah	2
F2	Buah	
S1	Biji	
S2	Biji	3
S3	Biji	

Perbedaan jumlah isolat yang ditemukan pada setiap organ dikarenakan metode yang digunakan berbeda setiap organ berbeda. Pada organ buah menggunakan metode *direct inoculation* karena organ buah memiliki tekstur yang mudah dibelah, sedangkan pada organ biji menggunakan metode pengenceran cawan tuang karena tekstur biji yang lebih keras daripada tekstur buah sehingga diperlukan penggerusan biji. Menurut Safitri (2013) menjelaskan metode cawan tuang memiliki kelebihan yaitu dapat mengisolasi organ yang bertekstur keras sehingga fungi endofit yang didapatkan lebih maksimal. Hasil isolasi fungi endofit dari buah dan biji juwet memiliki perbedaan karakter morfologi, diantaranya karakter makroskopis dan karakter mikroskopis. (tabel 4.2.).

Tabel 4.2 Karakter Morfologi Isolat Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels

Karakter Morfologi	Buah		Biji		
	Isolat F1	Isolat F2	Isolat S1	Isolat S2	Isolat S3
Permukaan Koloni atas	Tekstur koloni halus, tampak seperti kapas, berwarna abu-abu muda, pada hari keenam miselium berubah menjadu abu-abu kehitaman.	Tekstur permukaan kasar, miselia aerial tampak seperti kapas, berwarna putih, pada hari keenam miselium berubah menjadi coklat kuning kecoklatan.	Tekstur permukaan kasar, miselium tipis, warna koloni coklat muda, pada hari ketujuh miselium berubah warna menjadi coklat tua.	Tekstur permukaan halus, tampak seperti kapas, warna putih, pada hari kesepuluh warna berubah menjadi oranye.	Tekstur permukaan rata, miselium tipis, warna koloni putih. Pada hari ketujuh warna berubah menjadi coklat muda.
Permukaan sisi sebalik	Warna koloni coklat muda, setelah hari kelima warna berubah menjadi abu-abu kehitaman.	Warna koloni putih, setelah hari keenam warna berubah menjadi coklat kekuningan.	Warna krem pada miselium tua dan warna putih pada miselium muda.	Warna putih pada miselium muda, dan warna coklat muda pada miselum tua.	Warna putih pada miselium muda, dan warna putih kekuningan pada miselum tua.
Ukuran Koloni	Memenuhi permukaan media hari kelima	6,5 cm pada hari ketujuh	5,3 cm pada hari ke tujuh	6 cm pada hari ketujuh	6 cm pada hari ketujuh
Lingkaran Konsentris	Ada	Tidak ada	Ada	Ada	Ada
Hifa	Bersekat, bercabang	Tidak bersekat, bercabang	Bersekat, bercabang	Bersekat, bercabang Memiliki <i>appesorium</i> warna coklat, ujung tumpul.	Bersekat, bercabang
Konidia	Ukuran 8 – 11 µm. bentuk elips, apeks bulat datar, ada sekat	Ukuran 13 – 16 µm, bentuk elips, memiliki 2 <i>setulae</i> dan 1 <i>pedeciel</i> .	Tipe α-konidia ukuran 7 – 15 µm, bentuk elips, ujung tumpul, hialin	Ukuran 3 – 10 µm, bentuk silinder dengan ujung tumpul, hialin.	Ukuran 7 – 15 µm, bentuk elips, ujung tumpul, hialin
Dugaan Isolat	Neofusicoccum	Pestalotiopsis	Phomopsis	Colletotrichum	Phomopsis

Hal ini sesuai dengan firman Allah ﷺ di dalam Al-Qur'an surat Thaahaa ayat 53:

وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجَنَا بِهِ أَزْوَاجًا مِنْ نَبَاتٍ شَتَّى

Artinya : "Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuhan-tumbuhan yang bermacam-macam." (Q.S. Thaahaa:53).

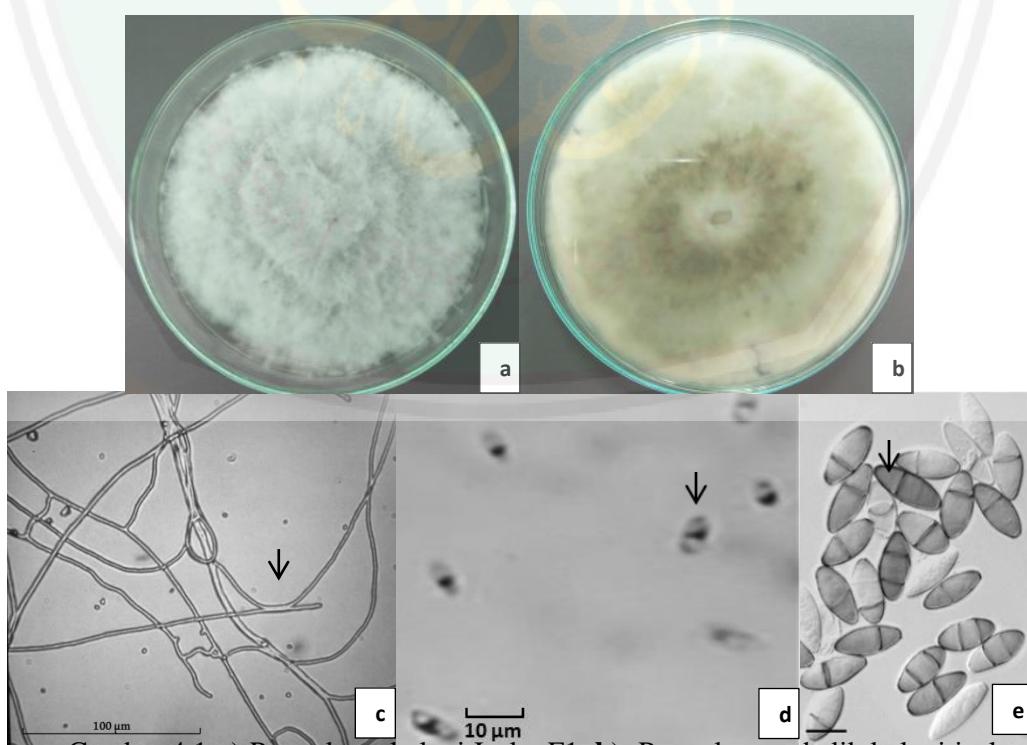
Menurut tafsir Al-Jazairi (2006) kalimat أزواجا adalah "berjenis-jenis" dan kalimat شتى artinya "beraneka warna serta rasa". Menurut tafsir Al-Qurtubi (2009) kalimat أزواجا من نبات شتى menjelaskan "tumbuhan bisa bermacam-macam", sedangkan menurut menurut Al-Mahalli dan As-Syuthi (2010) menjelaskan kalimat أزواجا من نبات شتى berarti "tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam." Berdasarkan tafsir tersebut, Allah ﷺ telah menciptakan bermacam-macam tumbuhan. Tumbuhan dapat juga dimaksud sebagai fungi, fungi memiliki struktur yang hampir sama dengan tumbuhan. Allah ﷺ telah menciptakan fungi dengan beraneka ragam. Hal ini dapat dilihat dari hasil isolasi fungi endofit buah dan biji yang menghasilkan fungi dengan karakter warna dan bentuk yang beraneka ragam.

Hasil isolasi kemudian dilakukan karakterisasi morfologi fungi endofit secara makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi morfologi makroskopis dan mikroskopis berhasil dilakukan dengan menggunakan buku dan jurnal literatur: *Pictoral Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species 2th Edition* (Watanabe, 2002); *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (Barnett & Barry, 2000); dan *The Botryosphaeriaceae: Genera and Species Known from Culture* (Philips et al, 2013).

4.1.1 Isolat F1

Hasil karakterisasi fungi endofit buah juwet isolat F1 secara makroskopis dan mikroskopis disajikan pada gambar 4.1. Isolat F1 ditumbuhkan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan suhu ruang. Koloni pada medium PDA sudah memenuhi permukaan media pada hari kelima.

Berdasarkan hasil pengamatan (gambar 4.1.a) pada permukaan koloni memiliki tekstur permukaan halus, tampak seperti kapas, berwarna abu-abu muda, pada hari ke enam miselium berubah menjadi abu-abu tua sampai kehitaman. Miselium aerial tinggi mencapai 5-7 cm, memiliki lingkaran konsentris. Pada permukaan sebalik koloni (gambar 4.1.b) memiliki warna koloni coklat muda. Setelah hari kelima, warna berubah menjadi abu-abu kehitaman. Terdapat lingkaran konsentris.



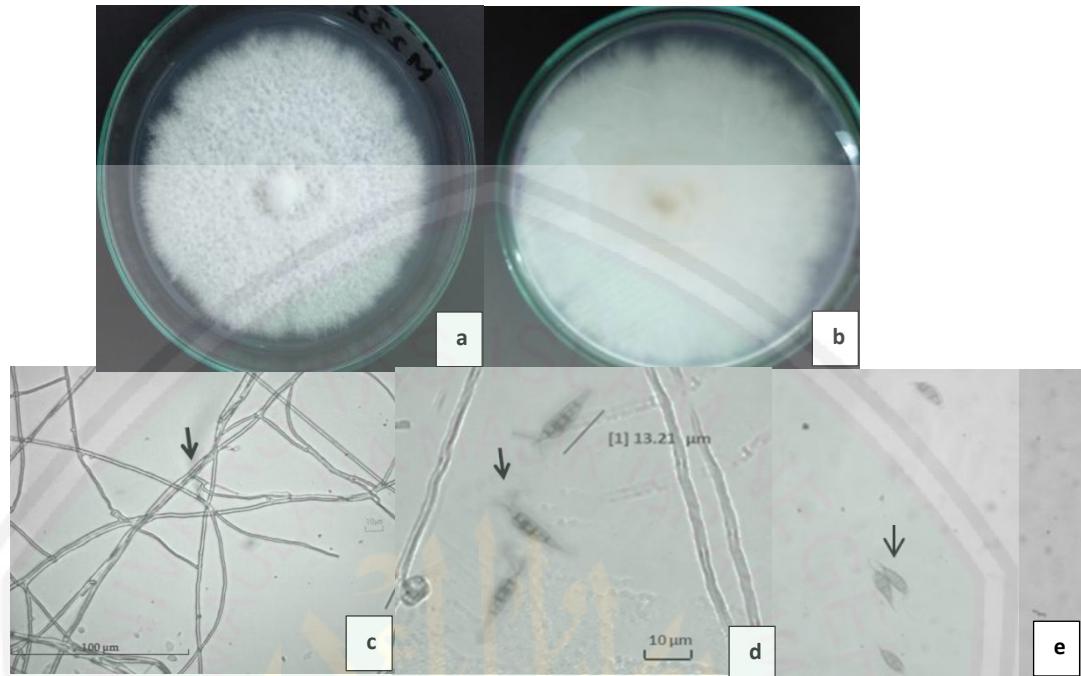
Gambar 4.1 a) Permukaan koloni Isolat F1, b) Permukaan sebalik koloni isolat F1, c) hifa perbesaran 00x, d) Konidium perbesaran 1000x, e) konidium skala 5 μ m (Philips et al, 2013).

Pada hasil pengamatan dengan perbesaran 1000x (gambar 4.1.c) menunjukkan isolat F1 memiliki hifa tidak bersekat, tetapi bercabang. Pada pengamatan mikroskopis (gambar 4.1.d) menunjukkan konidium berbentuk elips, apeks bulat dan datar, bersekat, warna coklat. Ukuran konidia berkisar 8 – 11 μm . Hal ini sesuai dengan gambar literatur (gambar 4.1.e) dengan konidium bentuk elips, apeks bulat datar, ada sekat, ukurannya berkisar 10 μm . Menurut kunci determinasi (*lampiran 3*) menunjukan dugaan isolat adalah *Neofusicoccum*. Menurut Philips (2013), konidium genus *Neofusicoccum* memiliki karakter bentuk oval atau elips, berwarna hialin dan kadang coklat (gambar 4.1).

4.1.2 Isolat F2

Hasil karakterisasi fungi endofit buah isolat F2 secara makroskopis dan mikroskopis disajikan pada gambar 4.2. Isolat F2 ditumbuhkan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan suhu ruang. Koloni pada medium PDA mencapai diameter 6,5 cm pada hari ketujuh.

Berdasarkan hasil pengamatan (gambar 4.2.a) pada permukaan koloni memiliki tekstur permukaan kasar, miselia aerial tampak seperti kapas berwarna putih, pada hari ke enam miselium berubah menjadi kuning kecoklatan. Pengamatan pada permukaan sebalik koloni (gambar 4.2.b) memiliki warna koloni putih. Setelah hari enam, warna berubah menjadi coklat kekuningan. Tidak memiliki lingkaran konsentris.



Gambar 4.2 a) Permukaan koloni Isolat F2, b) Permukaan sebalik koloni isolat F2, c) miselium (perbesaran 400x), d) konidia (perbesaran 1000x), e) konidia perbesaran 400x (Radi, 2017).

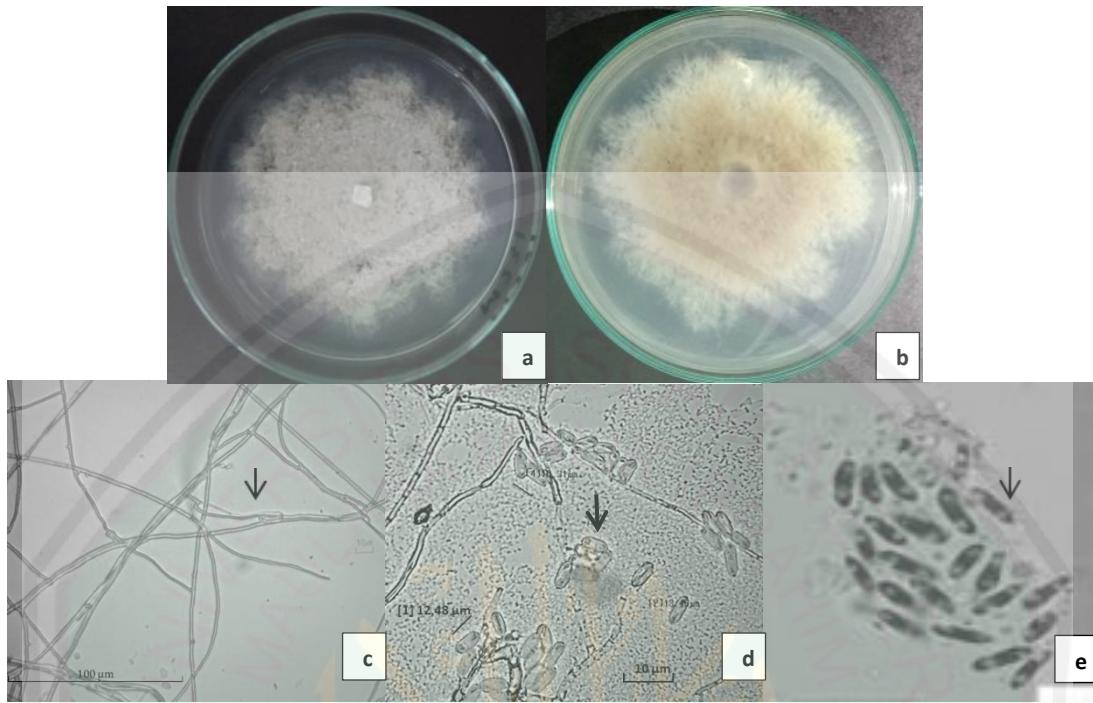
Pada hasil penampang mikroskopis dengan perbesaran 400x (gambar 4.2.c) menunjukkan hifa tidak bersekat tapi bercabang, sedangkan pada penampang mikroskopis perbesaran 1000x (gambar 4.2.d.) menunjukkan konidia berbentuk elips, dengan 4 – sel, warna hitam, dengan ukuran 13 – 16 μm . Konidia memiliki 2 *setulae* pada ujung apikal, dan memiliki 1 *pedicel* pada ujung basal. Hal ini sesuai gambar literatur (gambar 4.2.e) yang menunjukkan konidia memiliki 2 *setulae* yang berbentuk seperti benang, dan memiliki 1 *pedicel* yang berbentuk seperti benang halus. Menurut kunci determinasi (*lampiran 3*) menunjukan dugaan isolat adalah genus Pestaloptiopsis. Menurut Radi (2017), konidium genus Pestaloptiopsis memiliki karakter bentuk oval atau elips, memiliki sekat, memiliki *pedicel* pada ujung basal, dan *setulae* pada ujung apikal.

4.1.3 Isolat S1

Hasil karakterisasi fungi endofit buah isolat S1 secara makroskopis dan mikroskopis disajikan pada gambar 4.3. Isolat S1 ditumbuhkan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan suhu ruang. Koloni pada medium PDA mencapai diameter 5,3 cm pada hari ketujuh.

Berdasarkan hasil pengamatan (gambar 4.3.a) menunjukkan pada penampang permukaan koloni isolat S1 memiliki tekstur permukaan kasar, warna koloni coklat muda, pada hari ketujuh miselium berubah menjadi ciklat tua kehitaman. Memiliki lingakaran konsentris. Miselium isolat S1 ini sangat tipis. Pada penampang permukaan sebalik koloni (gambar 4.3.b) menunjukkan morfologi warna sebalik koloni yang memiliki warna krem pada miselia yang sudah tua, dan warna putih pada miselia yang masih muda. Isolat S1 memiliki lingkaran konsentris.

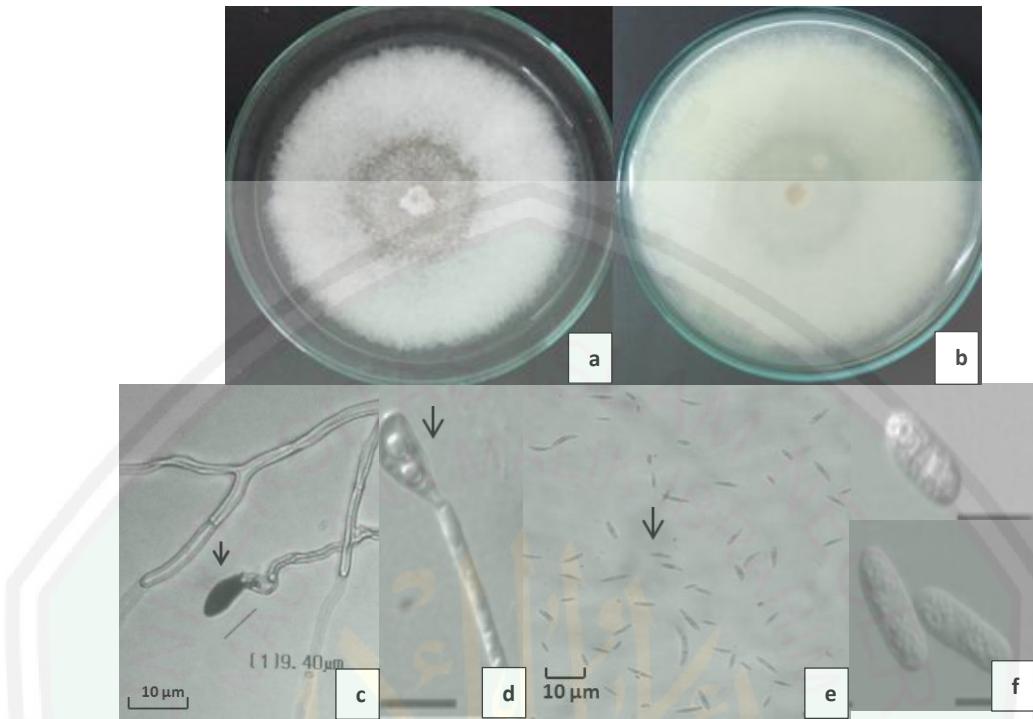
Pada penampang mikroskopik dengan perbesaran 400x (gambar 4.3.c) menunjukkan hifa bercabang dengan memiliki sekat. Pada hasil pengamatan (gambar 4.3.d) menunjukkan isolat S1 memiliki konidia dengan tipe α -konidia. Ukurannya berkisar 7 – 15 μm , berbentuk elips, ujung tumpul, berwarna hialin. Menurut kunci determinasi (*lampiran 3*) menunjukkan dugaan isolat adalah *Phomopsis*. Menurut Mahadevakumar (2017) menjelaskan konidium genus *Phomopsis* memiliki karakter bentuk oval atau elips, ujung tumpul, warna hialin (gambar 4.3.e).



Gambar 4.3 a) Permukssn koloni Isolat S1, b) Permukaan sebalik koloni isolat S1, c) miselium (perbesaran 400x), d) α konidia, e) α konidia (Mahadevakumar, 2017)

4.1.4 Isolat S2

Hasil karakterisasi fungi endofit dari biji juwet isolat S2 disajikan pada gambar 4.4. Isolat S1 ditumbuhkan pada medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan suhu ruang. Berdasarkan hasil pengamatan penampang permukaan koloni isolat S1 (gambar 4.4.a) menunjukkan koloni mencapai diameter 6 cm pada hari ketujuh. Tekstur permukaan halus. Hifa tampak seperti kapas. Warna hifa putih, pada hari kesepuluh, koloni berubah menjadi warna oranye. Memiliki lingkaran konsentris. Pada penampang permukaan sebalik koloni (gambar 4.4.b) memiliki karakter warna miselium putih. Memiliki lingkaran konsentris.



Gambar 4.4 a) *Upper side* koloni Isolat F2, b) *Reverse side* koloni isolat S2, c) Appressorium, d) Appressorium (Prihastuti, 2009), e) konidia, f) konidia (Prihastuti, 2009)

Pada penampang mikroskopis dengan perbesaran 400x (gambar 4.4.c) menunjukkan isolat S2 memiliki appressorium dengan bentuk oval dan warna coklat, memiliki ukuran 8 – 11 μm . Hal ini sesuai dengan gambar literatur (4.4.d) yang menunjukkan appesorium dengan warna coklat, ujung tumpul. Appesorium merupakan modifikasi dari hifa. Pada penampang mikroskopis perbesaran 400x (gambar 4.4.e) menunjukkan konidia berbentuk silinder dengan ujung tumpul, pigmentasi hialin, ukuran berkisar 3- 10 μm . Hal ini dapat dibandingkan dengan literatur (gambar 4.4.f) yang menunjukkan konidia bentuk silinder, memiliki ujung yang tumpul, pigmentasinya hialin. Menurut kunci determinasi (*lampiran 3*) menunjukan dugaan isolat adalah *Colletotrichum*. Menurut Prihastuti (2009), konidium genus *Colletotrichum*

memiliki karakter konidium elips atau silinder, memiliki ujung tumpul, pigmentasi hialin, ukuran berkisar $8 - 15 \mu\text{m}$ (gambar 4.4.d dan gambar 4.4.f).

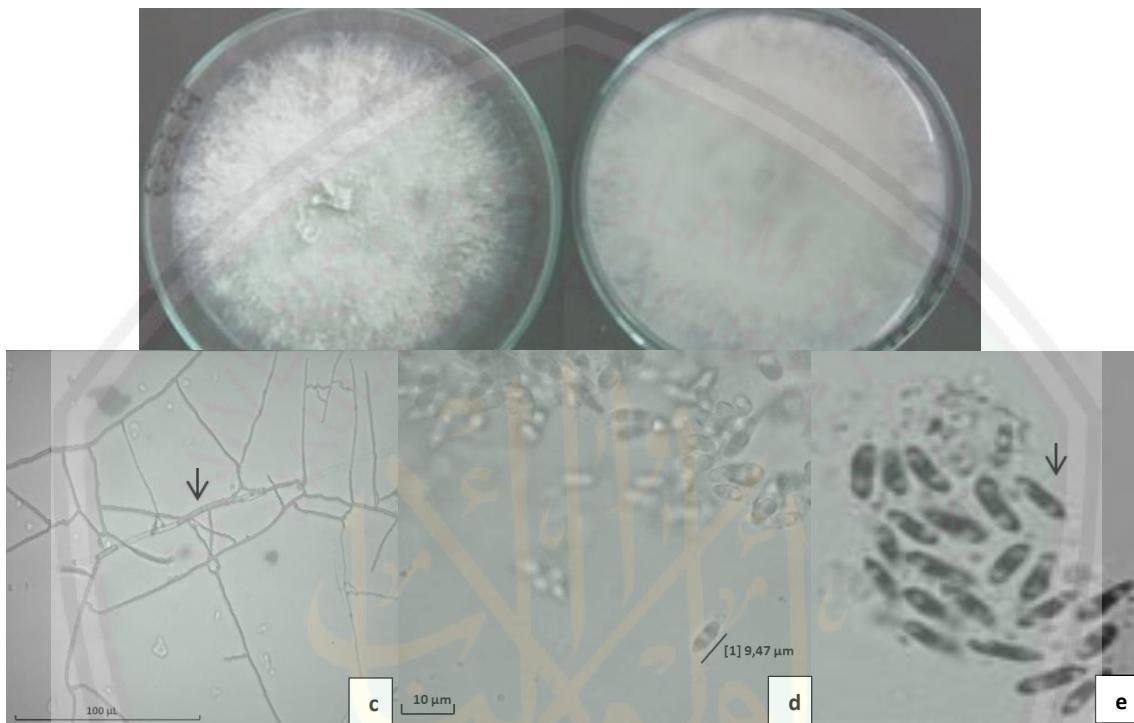
4.1.5 Isolat S3

Hasil karakterisasi fungi endofit dari biji juwet isolat S3 disajikan pada gambar 4.5. Isolat S3 adalah fungi endofit yang ditumbuhkan dari biji juwet. Isolat ini ditumbuhkan dari media PDA (*Potato Dextrose Agar*) dengan suhu inkubasi ruang.

Berdasarkan hasil pengamatan penampang makroskopik (gambar 4.5.a) menunjukkan bahwa koloni mencapai dimater 6 cm pada hari ketujuh pengamatan. Tekstur permukaan koloni rata. Miselium sangat tipis. Warna koloni putih pada miselium muda, sedangkan warna berubah menjadi coklat muda pada hari ketujuh . Pada penampang permukaan sebalik koloni (gambar 4.5.b) menunjukkan bahwa warna koloni putih. Pada hari kesepuluh, warna koloni menjadi putih kekuningan. Memiliki lingkaran konsentris.

Berdasarkan pengamatan mikroskopis dengan perbesaran 400x (gambar 4.5.c.) menunjukkan isolat memiliki hifa yang bercabang dan ada sekat. Pada gambar pengamatan (gambar 4.4.d) menunjukkan isolat S3 memiliki konidia dengan tipe α -konidia. Bentuk elips, ujung tumpul, pigmentasi hilain, ukuran berkisar $7 - 15 \mu\text{m}$. hal ini sesuai dengan gambar literatur (gambar 4.5.e) yang menunjukkan salah satu tipe konidia yaitu tipe α -konidia dengan karakteristik berbentuk oval atau elips, ujung tumpul, pigmentasi hialin kadang ada yang berwarna coklat. Menurut kunci determinasi (*lampiran 3*) menunjukan dugaan isolat adalah Phomopsis. Menurut Mahadevakumar (2017) menjelaskan

konidium genus *Phomopsis* memiliki karakter bentuk oval atau elips, ujung tumpul, warna hialin (gambar 4.3.e).



Gambar 4.5 a) Upper side koloni Isolat S3, b) Reverse side koloni isolat S3
c) hifa (perbesaran 400x), d) α konidia, e) α konidia (Mahadevakumar, 2017).

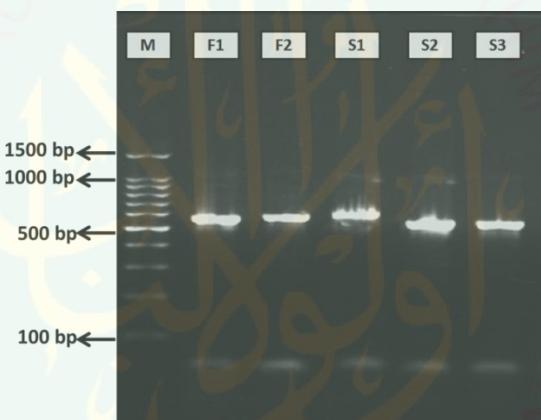
4.2 Identifikasi Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (*Syzygium cumini* L.)

Skeels Berdasarkan Penanda Molekuler rDNA ITS

Identifikasi fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels menggunakan DNA target daerah ITS. Menurut Vicente *et al.*, (2005) menjelaskan daerah ITS telah digunakan sebagai *barcode universal Kingdom Fungi*, sehingga penanda molekuler ITS sangat cocok untuk mengidentifikasi fungi. Selain itu daerah ITS hanya memiliki panjang *base pare* 500 – 800

sehingga sangat efisien. Daerah ITS juga merupakan *region conserved* sehingga cocok untuk digunakan pengidentifikasi spesies.

Hasil elektroforesis setelah PCR menunjukkan ukuran *band* yang berbeda-beda (gambar 4.6.). Pada isolat F1 dan F2 menunjukkan panjang 550 bp, pada isolat S1 memiliki panjang 600, sedangkan pada isolat S2 dan S3 memiliki panjang 500 bp. Hal ini sesuai literatur Porter (2011) menjelaskan daerah ITS pada kingdom jamur memiliki panjang rata-rata 500 – 600 bp untuk Ascomycetes dan Basidiomycetes.



Gambar 4.6 Visualisasi hasil PCR (100 volt, 30 menit). **M**) marker, **F1** isolat F1, **F2** isolat F2, **S1** isolat S1, **S2** isolat S2, **S3** isolat S3

Allah ﷺ berfirman di dalam Al-Qur'an surat Al-Furqaan ayat 2:

الَّذِي لَهُ مُلْكُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَلَمْ يَتَنَحَّدْ وَلَدًا وَلَمْ يَكُنْ لَهُ شَرِيكٌ فِي الْمُلْكِ وَخَلَقَ كُلَّ شَيْءٍ

فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا

Artinya: "Yang kepunyaan-Nya-lah kerajaan langit dan bumi, dan Dia tidak mempunyai anak dan tidak ada sekutu baginya dalam kekuasaan(Nya), dan Dia telah menciptakan segala sesuatu, dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya." (Q.S. Furqaan:2).

Menurut Al-Jazairi (2006) kalimat فَقَدَرَهُ تَقْدِيرًا adalah "Dia (Allah) telah menetapkan suatu ukuran dengan serapi-rapinya tanpa ada cela." Menurut tafsir

Al-Qurtubi (2009), kalimat ﴿قدره تقدیرا﴾ maksudnya adalah “*menetapkan segala sesuatu dari apa yang diciptakan-Nya sesuai dengan hikmah yang diinginkan-Nya, dan segala sesuatu berjalan sesuai dengan ketentuan-Nya.*” Menurut Al-Mahalli dan As-Syuthi (2010) menjelaskan kalimat ﴿قدره تقدیرا﴾ berarti “(*dan Dia menetapkan ukuran-ukurannya dengan serapi-rapinya*) secara tepat dan sempurna.”

Menurut Travers (2015) menjelaskan bahwa DNA merupakan salah satu material kehidupan yang penting bagi makhluk hidup. Susunannya yang terstruktur memberikan DNA sebagai pusat informasi dari individu. Berdasarkan tafsir Al-Qur'an dan literatur tersebut, dapat diimplementasikan dengan hasil dari panjang *base pare* daerah ITS yang telah terukur pasti berkisar 500 – 600 bp. Daerah ini dimiliki oleh setiap spesies fungi dengan karakteristik yang berbeda-beda, Allah ﷺ menciptakan daerah ITS ini dengan rapi dan teratur, ukuran yang pasti ini dapat dijadikan sebagai patokan pengidentifikasi DNA daerah ITS.

Hasil uji kualitatif dan kuantitatif (*lampiran 4*) akan mempengaruhi hasil sekuensing. berdasarkan hasil sekuensing yang dibaca menggunakan *sequence scanner* (*Lampiran 5*) menunjukkan grafik yang terdiri dari 4 warna. Hasil sequensing dikategorikan baik, hal ini ditunjukkan grafik memiliki puncak yang tinggi dan terpisah satu sama lain.

Hasil sekuensing kemudian dilakukan *Blast (Basic Local Alignment Search Tool)* untuk menganalisis kemiripan kedua sekuens (Ye, 2006). Hasil blast kemudian dapat mengetahui nilai identy spesies dari masing-masing isolat fungi endofit dengan spesies lain. Berdasarkan blast hasil sekuensing (tabel 4.3)

menunjukkan pada isolat F1 hasil blast menunjukkan spesies *Neofusicoccum parvum* tingkat kemiripan 99%, pada isolat F2 hasil blast menunjukkan *Pestalotiopsis vismiae* tingkat kemiripan 99%, pada isolat S1 hasil blast menunjukkan spesies *Phomopsis* sp. tingkat kemiripan 99%, pada isolat S2 hasil blast menunjukkan *Colletotrichum franticola* tingkat kemiripan 99%, dan pada isolat S3 hasil blast menunjukkan spesies *Phomopsis* sp. tingkat kemiripan 97%. Nilai *max identity* sebesar 99% mengindikasikan bahwa isolat dianggap sebagai spesies yang sama. Sedangkan homologi $\geq 97\%$ dapat dinyatakan bahwa isolat yang dibandingkan berada pada genus yang sama dan homologi antara 89-93% menunjukkan famili yang berbeda (Kwasna, 2008).

Tabel 4.3 Hasil Blast isolat Fungi Endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels

No	Hasil Isolasi		Hasil Blast			
	Kode isolat	Panjang base pair	Spesies	Ident	Sequence ID	Panjang base pair
1.	F1	558	<i>Neofusicoccum parvum</i>	99%	KY111851.1	569
2.	F2	575	<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	99%	KM513583.1	575
3.	S1	555	<i>Phomopsis</i> sp.	99%	GU066650.1	575
4.	S2	552	<i>Colletotrichum franticola</i>	99%	MF543120.1	538
5.	S3	558	<i>Phomopsis</i> sp.	97%	GU066650.1	575

Hasil blast *sequence* kemudian dilakukan analisis *p-distance* (*lampiran 6*) dan rekontruksi pohon filogenetik (gambar 4.7). Menurut Saitou (1987) menjelaskan hubungan kekerabatan dapat dibandingkan berdasarkan jarak genetik *p-distance* dari basa-basa nukleotidanya, sedangkan menurut Li *et al* (1999) salah satu tujuan rekontruksi pohon filogenetik adalah untuk mengkonstruksi dengan tepat hubungan antara organisme dan mengestimasi perbedaan yang terjadi dari satu nenek moyang kepada keturunannya. Sebelum dilakukan analisis *p-distance* dan rekontruksi filogenetik, maka dilakukan pensemajaran *allignment* (*lampiran 7*).

Rekontruksi pohon filogenetik pada penelitian ini menggunakan metode algoritma *Neighbor Joining* (NJ) dengan 1000 *Bootstrap* berdasarkan *p-distance*,. Kelebihan metode NJ adalah menggunakan metode aditifitas dan dapat digunakan untuk rekontruksi pohon dengan jumlah organisme yang banyak dan dataset yang besar dalam waktu relatif cepat (Brend, 2014).

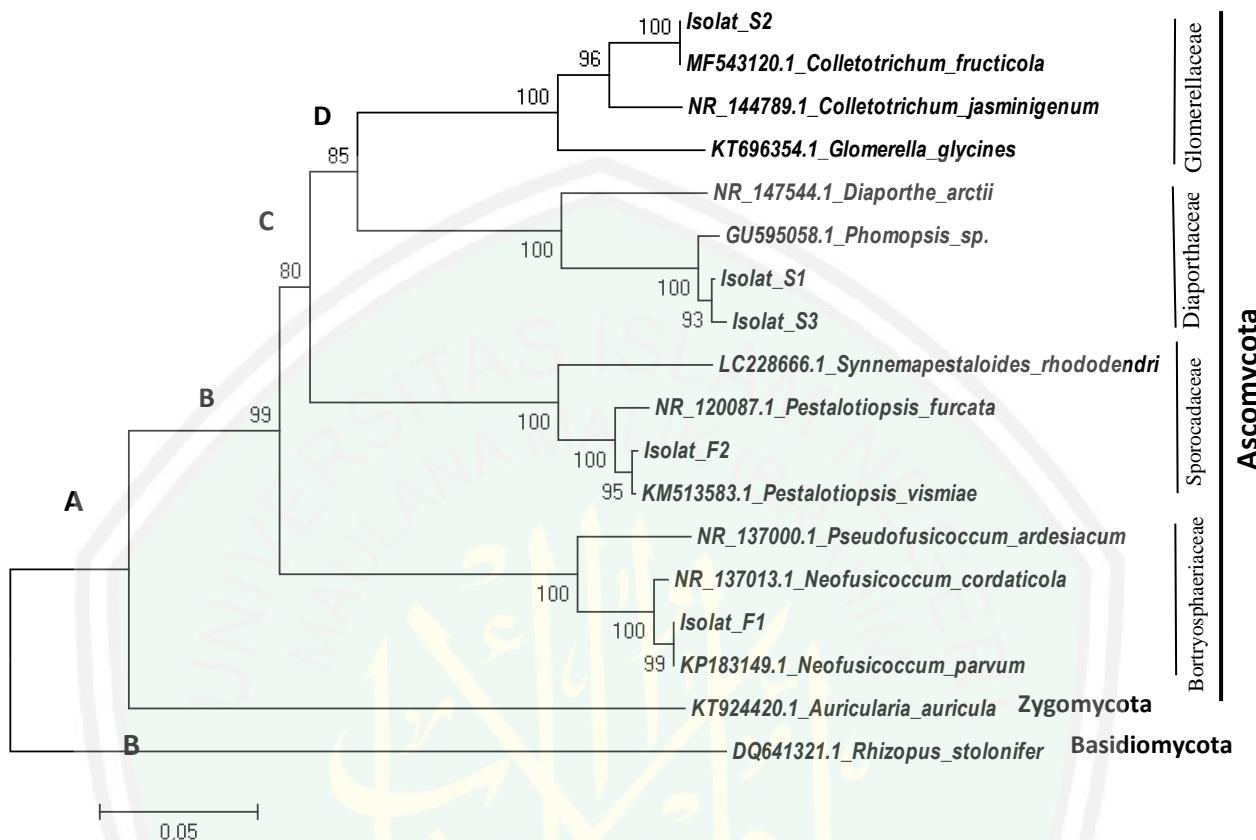
Hasil rekontruksi pohon filogenetik juga didapatkan nilai *bootstrap*. Metode *bootstrap* adalah metode yang menguji seberapa baik set data model. *Bootstrap* digunakan untuk mengevaluasi kestabilan cabang. Nilai *bootstrap* dilakukan untuk mengevaluasi kestabilan cabang. Pada pohon filogenetikan nilai *bootstrap* dikatakan stabil jika *bootstrap* nilai *bootstrap* ($>90\%$), sedangkan nilai *bootstrap* dikatakan rendah jika ($<70\%$) (Osawa *et al* 2004). Menurut Van De Peer (2003) menjelaskan kombinasi metode *Neighbor joining* (NJ) dengan analisis *bootstrap* dapat menjadi metode terbaik dalam mengevaluasi pohon-pohon filogenetik berbasis jarak.

Berdasarkan hasil rekontruksi pohon filogenetik, diketahui bahwa diperoleh empat *clade*. Pada *clade C* terdapat kelima isolat hasil isolasi fungi endofit dari buah dan biji juwet merupakan anggota kelas Ascomycota. Menurut Egbuta *et al* (2016) menjelaskan kelas Ascomycota merupakan kelas yang paling banyak dari kingdom Fungi, selain itu kelas Ascomycota umumnya hidup sebagai pengurai pada tumbuhan atau sisa organisme, sehingga kelas Ascomycota dapat mudah ditemukan pada berbagai jenis tumbuhan yang bersimbiosis baik sebagai endofit, saprofit, atau patogen.

Filogenetik isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet, jarak genetik dan nilai similaritas antar spesies dapat dihitung menggunakan MEGA 6.0 (*lampiran 6*). Nilai similaritas adalah berbanding terbalik dengan jarak genetik. Semakin kecil jarak genetik maka semakin besar nilai similaritas. Semakin kecil nilai koefisien similaritas (mendekati nol), maka hubungan kekerabatannya semakin jauhdan sebaliknya semakin besar nilai koefisien similaritas (mendekati seratus persen) maka hubungan kekerabatan semakin dekat Shamir (2001).

Menurut Nei (1987) jarak genetik menunjukkan tingkat perbedaan gen diantara populasi atau spesies. Pramarta (2014) juga menambahkan bahwa jarak genetik dapat menunjukkan kedekatan atau tidaknya hubungan kekerabatan antara sekuen nukleotida yang diamati. Menurut Shamir (2001), analisis jarak genetik dapat menunjukkan jarak genetik antara sampel dengan masing-masing individu yang menjadi spesies pembanding.

Pada kelas Ascomycota yang didapat menunjukkan isolat F1 berasal dari famili Botryosphaeriaceae. Isolat F1 memiliki jarak genetik 0,000 dan nilai similaritas 100% sehingga isolat F1 dengan *Neofusicoccum parvum* memiliki kemiripan identik. Tingkat homologi sekuen isolat F1 dapat ditunjukkan dengan nilai yang tertera pada warna grafik hasil *blast* (*Lampiran 8*). Warna grafik menunjukkan warna merah semua, sehingga dikategorikan tingkat homologi sekuen tinggi karena nilai >200. Nilai *bootstrap* isolat F1 adalah 99% sehingga dikategorikan percabangan stabil dan pohon filogenetik tidak akan berubah.



Gambar 4.7 Rekontruksi pohon filogenetik isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet metode Neighbor Joining, bootstrap 1000 pengulangan berdasarkan nilai *p-distance* basa-basa nukleotida rDNA ITS

Pada kelas Ascomycota yang didapat menunjukkan isolat F2 berasal dari famili Sporocadaceae. Isolat F2 memiliki jarak genetik 0,003 dengan nilai similaritas 99,73% sehingga isolat F2 dengan *Pestalotiopsis vismiae* memiliki nilai kemiripan tinggi. Tingkat homologi sekuen isolat F2 dapat ditunjukkan dengan nilai yang tertera pada warna grafik hasil *blast* (Lampiran 9). Warna grafik menunjukkan warna merah semua, sehingga dikategorikan tingkat homologi sekuen tinggi karena nilai >200. Nilai *bootstrap* isolat F2 dengan *Pestalotiopsis vismiae* adalah 95% sehingga dikategorikan percabangan stabil. Nilai *bootstrap* diantara 70-100 menunjukkan bahwa percabangan dan pohon filogenetik tidak akan berubah (Simpson, 2006).

Pada kelas Ascomycota yang didapat menunjukkan isolat S2 berasal dari famili Glomerellaceae. Isolat S2 memiliki jarak genetik 0,000 dengan nilai similaritas 100 % sehingga isolat S2 dengan *Colletotrichum fructicola* memiliki nilai kemiripan tinggi. Tingkat homologi sekuen isolat S2 dapat ditunjukkan dengan nilai yang tertera pada warna grafik hasil *blast* (*Lampiran* 11). Warna grafik menunjukkan warna merah semua, sehingga dikategorikan tingkat homologi sekuen tinggi karena nilai >200 . Nilai *bootstrap* isolat S2 adalah 100% sehingga dikategorikan percabangan stabil.

Pada kelas Ascomycota yang didapat menunjukkan isolat S1 berasal dari famili Sporocadaceae. Isolat S1 memiliki jarak genetik 0,011 serta nilai similaritas 98,930% sehingga isolat S1 dengan *Phomopsis* sp. memiliki nilai kemiripan $< 99\%$. Tingkat homologi sekuen isolat S1 dapat ditunjukkan dengan nilai yang tertera pada warna grafik hasil *blast* (*Lampiran* 10). Warna grafik menunjukkan warna merah semua, sehingga dikategorikan tingkat homologi sekuen tinggi karena nilai >200 . Nilai *bootstrap* isolat S1 dengan *Phomopsis* sp. adalah 100% sehingga dikategorikan percabangan stabil.

Pada kelas Ascomycota yang didapat menunjukkan isolat S3 berasal dari famili Sporocadaceae. Isolat S3 memiliki jarak genetik 0,016 serta nilai similaritas 98,40% sehingga isolat S3 dengan *Phomopsis* sp. memiliki nilai kemiripan $< 99\%$. Hal ini menyebabkan isolat S3 memiliki tingkat kesamaan sampai genus *Phomopsis* pada *sequence ID GU066650.1*. Tingkat homologi sekuen isolat S3 dapat ditunjukkan dengan nilai yang tertera pada warna grafik hasil *blast* (*Lampiran* 12). Warna grafik menunjukkan warna merah semua, sehingga

dikategorikan tingkat homologi sekuen tinggi karena nilai >200 . Nilai *bootstrap* isolat S3 adalah 100% sehingga dikategorikan percabangan stabil.

Isolat S1 dan isolat S3 hanya dapat diketahui sampai tingkat genus saja dikarenakan NCBI dengan nomor ID GU066650.1 menyediakan informasi sampai tingkatan genus. Namun isolat S1 lebih memiliki nilai *identity blast* yang lebih tinggi, nilai similaritas yang lebih tinggi, dan jarak genetik yang lebih rendah dengan *Phomopsis* sp. ID GU066650.1. dari pada isolat S3. Nilai *bootstrap* isolat S1 dan S3 adalah 93% sehingga dikategorikan percabangan stabil, sedangkan nilai *bootstrap* isolat S1, S3 dengan *Phomopsis* sp. ID GU066650.1 adalah 100% sehingga dikategorikan percabangan stabil dan tidak akan berubah.

4.3 Perbandingan Isolat Fungi Endofit dari Buah dan Biji Juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi dan Penanda Molekuler

Berdasarkan hasil blast, nilai similaritas, dan perhitungan jarak genetik, kemudian dibandingkan dengan karakter morfologi, maka diperoleh persamaannya. Isolat F1 adalah *Neofusicoccum parvum*, isolat F2 adalah *Pestalotiopsis vismiae*, isolat S1 adalah *Phomopsis* sp., isolat S2 adalah *Colletotrichum fructicola*, dan isolat S3 adalah *Phomopsis* sp. Isolat S1 dan isolat S3 memiliki kesamaan berdasarkan penanda molekuler yaitu sama-sama spesies *Phomopsis* sp. dengan *sequence ID* yang sama yaitu GU066650.1. Jika diamati dengan hasil perbandingan karakter morfologi pada tabel 4.2 menunjukkan isolat S1 dan isolat S3 memiliki karakter makroskopis yang berbeda, sehingga diduga kedua isolat adalah spesies yang berbeda. Namun, hasil blast menunjukkan kedua isolat berasal dari spesies dengan *sequence ID* yang sama.

Identifikasi konvensional berdasarkan morfologi memiliki kelemahan diantaranya adalah waktu penggeraan yang lama serta dapat menimbulkan kesalahan identifikasi terutama pada spesies yang berkerabat dekat (Geiser, 2004). Hal tersebut dikarenakan morfologi kapang yang sederhana, sehingga hanya sedikit karakter morfologi yang dapat digunakan untuk identifikasi (Geiser, 2004). Identifikasi secara molekuler diperlukan sehingga penentuan spesies dari isolat target dapat dilakukan dengan tepat.

Beberapa spesies fungi yang sama dapat bertindak sebagai endofit pada tanaman tertentu, sekaligus bertindak sebagai fungi patogen ataupun saprofit pada tanaman lain (Gomes, 2013). Menurut Udayanga (2011) faktor-faktor yang mempengaruhi simbiosis fungi dengan tanaman inang antara lain keadaan iklim inang, fisiologi inang, kandungan fitokimia inang. Kelima spesies yang ditemukan dalam buah dan biji juwet ditemukan sebagai fungi endofit, namun pada tanaman lain fungi tersebut dapat bertindak sebagai patogen ataupun saprofit.

Pada spesies *Neofusicoccum parvum* ditemukan pada daun *Artemisia madagascariense* (Jeewon, 2013) dan batang *Artemisia thuscula* sebagai fungi endofit (Cosoveanu, 2018), sedangkan ditemukan pada daun *Vitis vinifera* sebagai fungi patogen (Massonnet *et al*, 2017). Pada spesies *Pestalotiopsis vismiae* ditemukan di kulit *Pinus armandi* sebagai endofit (Hu, 2007), patogen pada daun *Leucospermum* sp., (Jaewon, 2004). Pada spesies *Colletotrichum fructicola* ditemukan pada daun *Pennisetum purpureum* (Manamgoda *et al*, 2013) dan buah *Coffea arabica* (Prihastuti, 2009) sebagai fungi endofit, sedangkan ditemukan pada buah *Capsicum annuum* sebagai patogen (Sharma, 2013). Pada spesies

Phomopsis vexans ditemukan daun *Solanum xanthocarpum* sebagai fungi endofit (Parthasarathy, 2015) dan ditemukan pada umbi *Solanum melongena* sebagai patogen (Gomes, 2013).



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Berdasarkan karakter morfologi fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels isolat F1 memiliki karakter tekstur halus, seperti kapas, warna abu-abu muda, konidia bentuk elips, bersekat, dugaan isolat *Neofusicoccum*. Isolat F2 tekstur permukaan kasar, miselia seperti kapas, putih, konidia elips, memiliki 2 *setulae* 1 *pedeciel* dugaan isolat *Pestalotiopsis*. Isolat S1 permukaan kasar, miselium tipis, warna coklat muda,tipe α -konidia, bentuk elips, ujung tumpul, hialin, dugaan isolat *Phomopsis*. Isolat S2 permukaan halus, seperti kapas, putih, konidium silinder ujung tumpul, hialin, dugaan isolat *Colletotrichum*. Isolat S3 tekstur permukaan rata, miselium tipis, putih, konidia elips, ujung tumpul, hialin, dugaan isolat *Phomopsis*.
2. Berdasarkan penanda molekuler rDNA ITS spesies isolat fungi endofit dari buah dan biji juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels isolat F1 adalah *Neofusicoccum parvum*, isolat F2 adalah *Pestalotiopsis vismiae*, isolat S1 adalah *Phomopsis* sp., isolat S2 adalah *Colletotrichum fructicola*, dan isolat S3 adalah *Phomopsis* sp.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian, diketahui beberapa isolat dari organ buah dan biji saja sehingga diperlukan identifikasi dari tanaman lain untuk memperoleh informasi diversitas fungi endofit dari tanaman juwet (*Syzygium cumini* L.) Skeels. Selain itu untuk mengetahui potensi dari isolat fungi endofit yang diperlukan ada uji lanjutan pada penelitian identifikasi fungi endofit ini berupa uji potensi kimia, fisiologi, dan lain sebagainya guna mendapatkan informasi yang lebih lengkap tentang potensi fungi endofit.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, Andria. 2009. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Agy, Mahmoud & Zaher E.H.F. 2015. Why Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) has been Selected as the DNA Barcode for Fungi?. *Advancements in Genetic Engineering*.4 (2).
- Al Qurthubi, Abu Abdillah Muhammad bin Ahmad. 2009. *Tafsir Al Qurthubi*. Terjemahan oleh Muhyidin Mas Rida. Jakarta: Pustaka Azam.
- Ali, Abdullah Yusuf. 1989. *The Holy Qur'an Translation and Commentary*. Brentwood: Amana Corp.
- Al-Jazairi, Abu Bakar Jabir. 2006. *Tafsir Al-Aisar*. Jakarta: Darus Sunnah
- Al-Mahalli, Jalaludin dan As-Syuthi Jalaludin. 2010. *Tafsir Jalalain*. Surabaya: Pustaka Elba.
- Arnold, A.E., Mejia L.C, Kyllo D., Rojas E.I., Maynard Z., Robbins N., Herre E.A. 2003. Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage In A Tropical Tree. *PNAS USA*. 100 (26).
- Ar-Rifa'i, Usamah. 2008. *Tafsirul Wajiz*. Jakarta: Mu'assasah Darul Ulum dan Darul Faiha.
- Ath-Tahabari, Abu Ja'far Muhammad bin Jarir. 2009. *Tafsir Ath-Thabari*. Terjemahan oleh Misbah. Jakarta: Pustaka Azam.
- Ayyanar, Muniappan & Pandurangan Subash Babu. 2012. Syzygium cumini (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2 (3).
- Azevedo, J.L., J.O.P Ereira, W.L. Araújo. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3 (1).
- Bacon, C.W. and White. 2000. *An overview of endophytic microbes: Endophytism Definition, Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker.
- Baldwin, B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Campbell C.S., Donoghue MJ. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Ann Missouri Bot Gard* 82:247–277.
- Barnet, H. L. and Hunter, B. B. 2000. *Illustrated Genera Of Imperfect Fungi (Third Edition)*. Minnesota: Burgess Publishing Company.
- Blackshields, G., I.M. Wallace, M. Larkin And D.G. Higgins. 2006. Analysis And Comparison Of Benchmarks For Multiple Sequence Alignment. *Silico Biol*. 6: 321 – 339.

- Borges, Aline., Mariana Silva R., Gustavo H. R., Jurema R. D. Q., Eduardo D. A. B., Elizabeth A. V. 2009. CTAB Methods for DNA Extraction of Sweetpotato for Microsatelite Analysis. *Sci. Agric.* 66 (4).
- Brend. 2014. Bioinformatik dan Konservasi. *Konservasi Biodiversitas Raja* 4. 3 (3).
- Brinkman, F. & D. Leipe. 2001. *Phylogenetic Analysis. In: Bioinformatics: A Practical Guide To The Analisys Of Gene And Protein.* New York : A John Wiley & Sons, Inc., Publication.
- Brito, E.S.D., Araujo M.C.D., Alves R.E, Carkeet C., Clevidence B.A, Novotny J.A. 2007. Anthocyanins Present In Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolao, Jussara, And Guajiru. *J Agri Food Chem.* 55: 9389-9394.
- Chase, M.W & Reveal J.L. 2009. A phylogenetic classification of land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of Linnean Society*, 161: 122-127
- Chaturvedi, A., Kumar M.M., Bhawani G., Chaturvedi H., Kumar M., Goel R.K. 2007. Effect Of Ethanolic Extract Of *Eugenia jambolana* seeds On Gastric Ulceration And Secretion In Rats. *Indian J Physiol Pharmacol.* 51: 131-140.
- Chaudhary B., Mukhopadhyay K., 2012 Syzygium cumini (L.) Skeels a Potential. Source of Nutraceuticals. *IJPBS.* 2: 46-53.
- Chen, L., Zhang Q. Y., Jia M., Ming Q. L., Yue W., Rahman K., 2016. Endophytic Fungi with Antitumor Activities: Their Occurrence and Anticancer Compound. *Crit Rev Micobiol.* 42: 454 – 473.
- Chowdhary, Kanika and Nutan Kaushik. Fungal Endophyte Diversity and Bioactivity in the Indian Medicinal Plant *Ocimum sanctum* Linn. *PLOSONE.* 10 (11).
- Cosoveanu , Hernandez M, Iacomi-Vasilescu B, Zhang X, Shu S, Wang M and Cabrera R. 2016. Fungi as endophytes in Chinese *Artemisia* spp.: juxtaposed elements of phylogeny, diversity and bioactivity. *Mycosphere.* 7 (2).
- Cosoveanu, Andreea., Samuel Rodriguez Sabina and Raimundo Cabrera. 2018. Fungi as Endophytes in *Artemisia thuscula*: Juxtaposed Elements of Diversity and Phylogeny. *Journal of Fungi.* 4 (17).
- Cronquist, A. 1981. *An Intergrated System of Clasification of Flowering Plants.* New York: Columbia University Press.
- Dalimatra. 2003. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid II.* Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Dharmayanti, N.L.P. Indi. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *WARTAZOA.* 21 (1).
- Doyle., J.J. & Doyle J.L. 1987. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin.* 19:11-15.

- Edgar, R.C. & S. Batzoglou. 2006. Multiple Sequence Alignment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6: 368 – 373.
- Egbuta, Mary Augustina., Mulunda Mwanza, Olubukola Oluranti Babalola. 2016. A Review of the Ubiquity of Ascomycetes Filamentous Fungi in Relation to Their Economic and Medical Importance. *Advances in Microbiology*. 6: 1140-1158.
- Estabrook. 1984. Phylogenetic Trees And Character-State Trees. In: *Perspectives on the Reconstruction Evolutionary History Cladistics*. DUNCAN, T. and T. STUESSY (Eds.). Colubia: Columbia University Press.
- Faeth, S.H., and Fagan, W.F. 2002. Fungal Endophytes: Commonhostplant Symbiontsbutun Common Mutualissts. *Integr. Comp. Biol.* 42: 360–368.
- Fahn. 1991. *Anatomi Tumbuhan* (terj. Ahmad Soediarto dkk.) Edisi ke-3. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Fajarningsih, Nurrahmi Dewi. 2016. Internal Transcribed Spacer (Its) As Dna Barcoding To Identify Fungal Species: A Review. *Postharvest and Biotech.* 11 (2).
- Farswana, M., Mazumder P., Parcha V. 2009. Modulatory Effect Of An Isolated Compound From *Syzygium cumini* Seeds On Biochemical Parameters Of Diabetes In Rats. *International Journal of Green Pharmacy*. 3: 128-133.
- Firakova, S., Sturdikova, M., and Muckova. 2007. Bioactive Secondary Metabolites Produces by Microorganism Associated With Plants. *Biologia*. 62:251-257.
- Gandjar, I., Robert A. S., Karin V. D. Ariyanti O., Iman S., 1999. *Pengenalan Kapang Tropik Umum*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Geisen, S., Kostenko, O., Cnossen, M. C., ten Hooven, F. C., Vreš, B., & van der Putten, W. H. 2017. Seed and Root Endophytic Fungi in a Range Expanding and a Related Plant Species. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1645.
- Giasuddin, A. S. M. 1995. Polymerase Chain Reaction Technique: Fundamental Aspects And Applications In Clinical Diagnostics. *Journal of Islamic Academy of Sciences*. 8 (1).
- Gomes, R. R., Glienke, C., Videira, S. I. R., Lombard, L., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia : Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 31: 1–41.
- Hall. 1999. BioEdit a User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Progam fow Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 41:95 – 98.
- Heyne. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia* Jilid 3. Jakarta: Yay. Sarana Wana Jaya.

- Hidayat, Topik & Adi Pancoro. 2006. Kursus Singkat Aplikasi Perangkat Lunak PAUP dan MrBayes untuk Penelitian Filogenetika Molekuler. Bandung: SITH-ITB.
- Hu, Hongli & Jeewon, Rajesh & Zhou, Dequn & Zhou, Tongxin & Hyde, Kevin. 2007. Phylogenetic diversity of endophytic Pestalotiopsis species in Pinus armandii and Ribes spp.: evidence from rDNA and beta-tubulin gene phylogenies. *Fungal diversity*. 24:1-22.
- Ibnu Kasir. 2000. *Tafsir Ibnu Kasir*. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- James, Harris. 1986. Modified Method for Fungal Slide Culture. *Journal of Clinical Microbiology*. 24 (3).
- Jeewon, R., Jayesh Ittoo, Devendra Mahadeb, Yasmina Jaufeerally-Fakim, Hong-Kai Wang, and Ai-Rong Liu. 2013. DNA Based Identification and Phylogenetic Characterisation of Endophytic and Saprobiic Fungi from Antidesma madagascariense, a Medicinal Plant in Mauritius. *Journal of Mycology*, 2013 (10).
- Jeewon, Rajesh., Liew, E.C.Y., Hyde., Kevin., Liew, R., & Hyde, E. 2004. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of Pestalotiopsis in relation to host association. *Fungal Diversity*. 17 (1).
- Kemena, C. And C. Notredame. 2009. Upcoming Challenges For Multiple Sequence Alignment Methods In The Hightthroughput Era. *Bioinformatics*. 25 (19).
- Kumar, A., Ilavarasan R., Jayachandran T., Deecaraman M., Kumar R.M., Aravindhan P., Padmanabhan N., Krishan M.R.V. 2008. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* seed. *Afr J Biotechnol*. 7: 941-943.
- Kurtzman CP and Robnett CJ. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res*. 3 (4).
- Kwasna H, Bateman GL, Ward E, 2008. Determining species diversity of microfungal communities in forest tree roots by pure-culture isolation and DNA sequencing. *Applied Soil Ecology* 40: 44–56.
- Li, L., Adams L.S., Chen S., Killian C., Ahmed A., Seeram N.P. 2009. *Eugenia jambolana* Lam. berry Extract Inhibits Growth And Induces Apoptosis Of Human Breast Cancer But Not Non-Tumorigenic Breast Cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57: 826-831.
- Li, S., D. Pearl And H. Doss. 1999. Phylogenetic Tree Construction Using Markov Chain Monte Carlo. Fred Hutchinson Cancer Research Center Washington. [Http://Www.Stat.Ohiotate.Edu/~Doss/Research/Mctrees](http://Www.Stat.Ohiotate.Edu/~Doss/Research/Mctrees).
- Li, Shuying Pearl and Doss. 1999. Phylogenetic tree construction using Markov Chain Monte Carlo. *Journal of the American Statistical Association*. 95 (450).

- Lipscomb, D. 1998. Basics Of Cladistic Analysis. Student Guide Paper. George Washingtonuniversity.<http://www.gwu.edu/~clade/faculty/lipscomb/cladistic>.
- Liston, A., Robinson W.A., Oliphant J.M., Alvarez-Buylla E.R. 1996. Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed region of non-flowering seed plants. *Syst Bot.* 21(2).
- Loganayaki N., Manian S. 2010. *In vitro* antioxidant properties of indigenous underutilized fruits. *Food Science and Biotechnology.* 19: 725-734.
- Ma, Wei., Xiubo Liu., Jiao Jiao., Leiming Zhang., Weichao Ren., Ling Ma., Xiangjun Kong., Ning Zhang., Xiwu Zhang. 2014. Purification Of Four Strains Of Endophytic Fungi From *Astragalus* And Their Optimized Liquid Fermentations. *Journal of Forestry Research.* 25 (3).
- Maggini, F., Marrocco R., Gelati T.M., De Dominicis RI. 1998. Length and nucleotide sequences of the internal spacers of nuclear ribosomal DNA in gymnosperms and pteridophytes. *Plant Syst Evol* 213(3).
- Mahadevakumar, S., Amruthavalli C, Sridhar, & Janardhana GR. 2017. Prevalence, incidence and molecular characterization of *Phomopsis vexans* (*Diaporthe vexans*) causing leaf blight and fruit rot disease of brinjal in Karnataka (India). *Plant Pathology & Quarantine.* 7(1).
- Malinowski, D.P. and Belesky. 2006. Ecological importance of *Neotyphodium* spp. Grass endophytes in agroecosystems. *Grassland Science.* 52 (1).
- Malinowski, D.P., H. Zuo, D.P. Belesky and G.A. Alloush. 2004. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp., Endophytes. *Plant and Soil.* 267: 1-12.
- Manamgoda Dimuthu S., & Dhanushka Udayanga, Lei Cai, Ekachai Chukeatirote, Kevin D. Hyde. 2013. Endophytic Colletotrichum from tropical grasses with a new species C. Endophytica. *Fungal Diversity.* 61:107–115.
- Manjunatha, B., Mohana Kumara, Ravikanth, Gudasalamani, Singh, Shweta, Suryanarayanan, Trichur, K. N., Ganeshiah, Uma Shaanker. 2013. Do Endophytic Fungi Possess Pathway Genes For Plant Secondary Metabolites?. *CURRENT SCIENCE.* 104 (2).
- Massonnet, M., Figueroa-Balderas R, Galarneau ERA. 2017. *Neofusicoccum parvum* Colonization of the Grapevine Woody Stem Triggers Asynchronous Host Responses at the Site of Infection and in the Leaves. *Frontiers in Plant Science.* 8 (11).
- Meshram, G.A, Yadav S.S., Shinde D., Patil B., Singh D. 2011. Antibacterial Study And Effect Of Ethanolic Extracts Of *Syzygium cumini* Seeds Powder On Glucoamylase *In Vitro*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Researc.* 3: 1060-1063.
- Morton, Julia. 1987. *Fruits of warm climates*. Miami: FL, pp.281-286.

- Mount. 2001. *Phylogenetic Prediction. In: Bioinformatic, Sequence And Genome Analysis.* New York: New York Press.
- NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.
- Nei. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method ForRecon- Structing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Nicholas, F.W. 1993. *Veterinary Genetics.* New York: Oxford University Press.
- Osawa, S., S. Zhi-Hui & Y. Imura. 2004. *Molecular Phylogeny and Evolution of Carabid Graound Beetles.* Springer-Verlag Tokyo: SNP Best-set Typesetter Ltd.
- Parthasarathy, Ramalingam & Muthukrishnan Sathiyabama. 2015. Lovastatin-producing endophytic fungus isolated from a medicinal plant *Solanum xanthocarpum*. *Journal Natural Product Research.* 29 (24).
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology.* 76(1).
- Poczai, Petter and Jaakko Hyvonen. 2010. Nuclear Ribosomal Spacer Regions In Plant Phylogenetics: Problems and Prospects. *Mol Biol Rep.* Vol 37:1897–1912.
- Porter , Golding GB. 2011. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons?. *New Phytol.* 192 (3).
- Porter, C.H. and Collins FH. 1991. Species-diagnostic differences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg.* 45:271–279.
- Pradhan, Madhulika. 2016. Phytochemistry, Pharmacology and Novel Delivery Applications of *Syzygium cumini* (L.). *Human Journals Review Article.* 7 (1).
- Pramarta, I. G. R. 2014. Identifikasi Spesies Potyvirus Penyebab Penyakit Mosaik Pada Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum Frutescens* L.) Melalui Sikuen Nukleotida Gen Coat Protein. *Tesis.* Denpasar: Universitas Udayana.
- Prasetyoputri, A.; & Atmosukarto, I. 2006. Mikroba Endofit: Sumber Molekul Acuan Baru yang Berpotensi. *BioTrends.* 1 (2).
- Prihastuti H, Cai L, Chan H, McKenzie EHC, Hyde KD. 2009. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Divers.* 39:89–109.

- Radi, Hamid Cheraghian & Javad Hamed. 2017. Overview of *Pestalotiopsis vismiae* UTMC 5019 as a Potential Agent for the Biological Control of *Hordeum spontaneum* (Wild Barley). *J. Biol. Today's World.* 6 (12).
- Radji, M. 2005. Peranan bioteknologi dan mikroba endofit dalam pengembangan obat herbal. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* 2 (3).
- Rekha, N., Balaji R., Deecaraman M. 2010. Antihyperglycemic And Antihyperlipidemic Effects Of Extracts Of The Pulp Of *Syzygium cumini* and Bark Of *Cinnamom zeylanicum* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Applied Bioscience,* 28: 1718-1730.
- Reynetron, K.A, Basile M.J, Kennelly E.J. 2005. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. *Ethnobot Res Ap.* 3:25 – 35.
- Rodriguez, R.J., White, J.F. Jr., Arnold, A. E., and Redman, R. S. 2009. Fungal Endophytes: Diversity and Functional Roles. *New Phytol.* 182:314–330.
- Rohadi., dkk. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Duwet (*Syzygium cumini* Linn.) Pada Peroksidasi Lipida Secara In Vitro. *AGRITECH.* 36 (1).
- Safitri, Dian & Samingan. 2013. Isolasi Dan Identifikasi Fungi Amilolitik Pada Bonggol Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L.) *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi, Biologi Edukasi.* 5 (1).
- Sagrawat, A. Mann & Kharya. 2006. Pharmacological Potential of Eugenia Jambolana: A Review. *Pharmacogenes Magazice.* 2: 96-104.
- Saitou, N. & M. Mei. 1987. The Neighbor-Joining Method: A New Method For Constructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406 – 425.
- Sambrook, J., and Russel, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3th Edition.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sambrook,J. 2006. *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt. 2003. Phylogenetic Trees From Large Datasets. Inaugural-Dissertation,DusseldorfUniversity.<http://www.bi.uni-duesseldorf.de/~hschmidt/publ/schmidt2003.phdthesis>.
- Schulz, B.; & Boyle, C. 2006, What Are Endophytes? Microbial Root Endophytes. *Springer-Verlag.* 9: 1-13
- Sharma Gunjan and Belle Damodara Shenoy. 2013. *Colletotrichum fructicola* and *C. siamense* are involved in chilli anthracnose in India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 7 (10).
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Mishbah.* Jakarta: Lentera Hati.
- Simpson. M.G. 2006. *Plant Systematic.* California: Elsevier Academic Press.
- Sivasubramaniam, K. and Selvarani. 2012. Viability and vigor of jamun (*Syzygium cumini*) seeds. *Brazilian Journal of Botany.* 35 (4).

- Skutkova, Helena., Martin Vitek., Sona Krizkova, Rene Kizek, Ivo Provaznik. 2013. Preprocessing and Classification of Electrophoresis Gel Images Using Dynamic Time Warping. *Int. J. Electrochem. Sci.*, Vol 8: 1609 – 1622.
- Srivastava, S. and Chandra D. 2013. Pharmacological Potentials of *Syzygium cumini*: A Review. *J. Sci. Food Agr.* 93 (9).
- Strobel, G.A. 2003. Endophytes as source of bioactive products. *Microbiol. Infect.* 5: 535-544.
- Strobel, G.A., Hess, W. M., Ford, E., Sidhu, R.S. and Yang, X. 1996. Taxol from Fungal Endophytic and The Issue of Biodiversity. *J. Industrial Microbiol.* 17:417- 425.
- Strobel, Gary A. & Bryn Daisy. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Product. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 491-502.
- Subowo. 2011. *Biologi Sel.* Jakarta: CV. Agung Seto.
- Tamura, Koichiro., Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski, and Sudhir Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analyse tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876– 4882.
- Tintjer, T. & Rudger. 2006. Grass-herbivore interaction altered by strains of a native endophyte. *New Phytologist*. 170: 513-521.
- Travers, Andrew., and Georgi Muskhelishvili. 2015. DNA structure and function. *FEBS Journal*. 282 (12).
- Udayanga, Dhanushka, Xingzhong Liu, Eric H. C. McKenzie, Ekachai Chukeatirote, Ali H. A. Bahkali, Kevin D. Hyde. 2011. The genus Phomopsis: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*. 50:189–225.
- Veigas, J.M., Narayan M.S, Laxman P.M, Neelwarne B. 2007. Chemical Nature Stability And Bioefficacies Ofanthocyanins From Fruit Peel Of *Syzygium cumini* Skeels. *Food Chem.* 105 (2).
- Verheij, E.M.W. dan R.E. Coronel, 1997. *Sumber Daya Nabati Asia Tenggara, Buah-buahan yang Dapat Dimakan*. Terjemahan S. Somaatmadja. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Vicente, M.C, F.A. Guzman, J. Engels,V.R Rao. 2005. Genetic Characterization and its use in Decision Making for the Conservation of Corp Germplasm. *The Role Biotechnology*. 121-128.

- Vijayanand, P., Rao L.J.M., Narasimham P. 2001. Volatile flavour componentsi of Jamun fruit (*Syzygium cumini*). *Flavour Fragr J.* 16:47–49.
- Wang, J. W., Zheng L. p., Xiang T. R. 2006. The Preparation of An Elicitor from a Fungal a Endophyte to Enhance Artemisinin Production in Hairy Root Cultures of *Artemisia Annua* L. *Journal Biotechnol.* 22, 829 – 834.
- Waqas, Muhammad, Abdul Latif Khan, Raheem Shahzad, Ihsan Ullah, Abdur Rahim Khan. 2015. Mutualistic Fungal Endophytes Produce Phytohormones And Organic Acids That Promote Japonica Rice Plant Growth Under Prolonged Heat Stress. *J Zhejiang Univ Sci B.* 16 (12).
- Watanabe, Tsuneo. 2002. *Pictoral Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species 2th Edition*. New Yok: CRC Press.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. In M. A. Innes, D. H. Gelfand, J. S. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. London: Academic Press.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier. 4:77–100.
- Ye, J., McGinnis, S., & Madden, T. L. 2006. BLAST: improvements for better sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 34(W6–W9).
- Zhang, H.W., Y.C. Song, R.X. Tan. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Pro.Rep.* 23: 753-771.
- Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 7 :203-14.

Lampiran 1

Formula pembuatan 2x CTAB adalah sebagai berikut:

Standard DNA extraction protocol	
<i>Jer-Ming Hu July 4, 2002</i>	
2X CTAB Buffer:	(Per 200 ml)
100 mM Tris-HCl (pH8.0)	20 ml 1 M Tris-HCl pH 8.0
1.4 M NaCl	56 ml 5 M NaCl (or 16.4 g)
20 mM EDTA	16 ml 0.5 M EDTA
2% CTAB	4.0 g powder
2% PVP40	4.0 g
0.2% β -mercaptoethanol	add right before use

Lampiran 2

Modifikasi Metode Doyle & Doyle

Metode Doyle&Doyle	Modifikasi
Disiapkan daun segar telah halus sebanyak 0.5 – 100 mg.	diambil miselium fungi endofit yang berumur 7 hari sebanyak 100 mg
Ditambahkan CTAB (2% CTAB [Sigma H-5882], 1.4 M NaCl, 0.2% 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0)	Ditambahkan 1000 µl bufer 2X CTAB {100 mM Tris-HCL (pH 8), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 2% PVP, 0.2% β-mercaptoethanol} dan divortex
diinkubasi di dalam waterbath 60°C selama 30 menit.	diinkubasi di dalam waterbath 65°C selama 60 menit.
ditambah 1x volume (24:1) <i>chlorofrom:isoamilalkohol</i> .	ditambah 900 µl (24:1) <i>chlorofrom:isoamilalkohol</i> .
-	Diinkubasi di suhu ruang selama 1 jam.
-	Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit
Diambil supernatant, dipindah ke tube baru	Diambil supernatant, dipindah ke tube baru
-	ditambah 900 µl (24:1) <i>chlorofrom:isoamilalkohol</i> .
-	disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit.
	Diambil supernatant dan dipindah pada tube 1.5 Ml
Ditambah isopropanol sebanyak $\frac{2}{3}$ volume supernatant	Ditambah isopropanol sebanyak $\frac{2}{3}$ volume supernatant
Dinkubasi semalam	Diinkubasi semalam suhu -4°C.
Ditambah	-
Disentrifugasi 6000x g (10 menit)	Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit.
Dicuci pellet dengan (76% EtOH, 10 mM ammonium acetate).	dicuci pellet dengan 500 µl <i>ethanol absolute</i> .
Disentrifugasi 6000x g (10 menit), dibuang supernatant	Selanjutnya disentrifugasi 13000 rpm selama 5 menit dibuang supernatant,
-	dikering anginkan di oven 25°C.
Ditambahkan 50 µl TE Buffer.	Ditambahkan 50 µl TE Buffer.
Disimpan pada suhu -4°C.	Disimpan pada suhu -4°C

Lampiran 3

KUNCI DETERMINASI

A. Kunci determinasi *Neofusicoccum*

(Philips, 2017)

1.	Conidia formed within a pycnidium	2	<i>Neoscytalidium</i>
	Conida formed as dry powdery arthric chains		
2.	Conidia hyaline (only rarely turn brown with age)	3	
2.	Conidia brown (can remain hyaline for some time before becoming brown)	8	
3.	Conidia hyaline, with persistent mucous sheath	4	
3.	Conidia hyaline, mucous sheath absent	5	
5.	Conidia thin-walled	6	
5.	Conidia thick-walled	9	
6.	Conidia mostly fusoid to ellipsoidal	7	<i>Botryobambusa</i>
6.	Conidia cylindrical to cylindro-clavate		
7.	Most conidia longer than 30 µm		<i>Copriniforma</i>
7.	Conidia mostly less than 30 µm long		<i>Botryosphaeria/Neofusicoccum2</i>

B. Kunci Determinasi *Pestalotiopsis*

(Watanabe, 2002)

1.	Setae formed	2	
	not formed	6	
6.	Conidia simple	7	
	complicated	13	
7.	Conidia with filiform appendages	8	
	not so	9	
8.	Conidia cylindrical, concolor		<i>Hyphodiscosia</i>
	ellipsoidal with central dark cells and hyaline end cells		<i>Pestalotia</i>

C. Kunci Determinasi *Colletotrichum*

(Barnett, 1972)

1a	Conidia 1-celled, short, not filiform	2
1b	Conidia 2- to several-celled, not filiform, didymosporous or phragmosporous	7
1c	Conidia filiform, 1- to several-celled	12
1d	Conidia dictyosporous or staurosporous	14
2a	Conidia with distinct dark pigment	<i>Melanconium</i> 190
2b	Conidia hyaline	3
3a	Conidia produced laterally on conidiophore	<i>Catenophora</i> 188
3b	Conidia produced apically on conidiophore	4
4a	Conidia with apical, hyaline branched appendages	<i>Pestalozziella</i> 188
4b	Conidia without appendages	5
5a	Dark setae present in acervulus	<i>Colletotrichum</i> 188
5b	Dark setae absent	6

D. Kunci Determinasi *Phomopsis*

(Barnett, 1972)

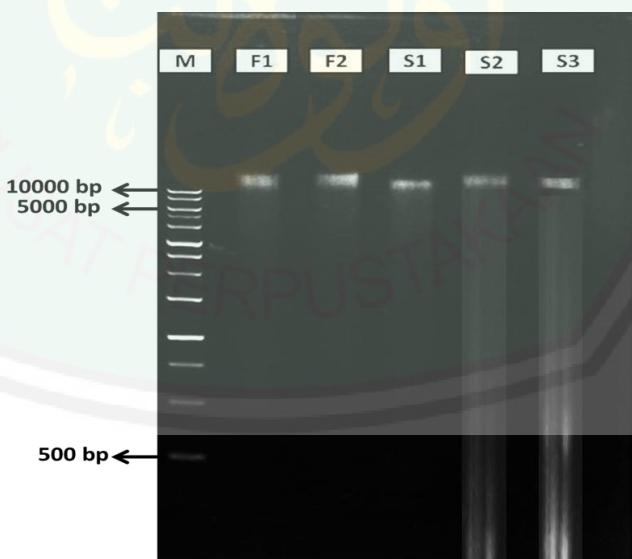
1a	Conidia globose to oblong or ellipsoid, not filiform	2
1b	Conidia filiform, at least several times longer than wide, I- to several-celled (scolecosporous)	62
2a	Conidia 1 -celled	3
2b	Conidia typically 2-celled	45
2c	Conidia typically 3- to several-celled	52
3a	Conidia hyaline, or sometimes brightly pigmented in mass	4
3b	Conidia with dark pigment, evident at least in mass	40
4a	Pycnidia complete, or with well developed base	5
4b	Pycnidia not complete, with only the upper portion well developed	37
5a	Pycnidia separate, not in stromata	6
5b	Pycnidia in stromata, frequently evident only by pycnidial cavities	29
6a	Pycnidia mostly ovoid; parasitic on powdery mildews	<i>Ampelomyces</i>
6b	Pycnidia with long beak or neck; not parasitic on powdery mildews	7
6c	Pycnidial beak short or absent; not parasitic on powdery mildews	9
9a	Pycnidia breaking open irregularly, without a distinct ostiole	10
9b	Pycnidia opening by distinct ostioles	18
18a	Pycnidia on subiculum of radiating hyphae	<i>Asteromella</i>
18b	Pycnidia <i>not on</i> subiculum ,	19
19a	Conidia of 2 kinds: short-ovoid and long-curved or bent	<i>Phomopsis</i>

Lampiran 4

HASIL UJI KUALITATIF DAN KUANTITATIF WHOLE GENOM

Isolasi DNA fungi endofit dari buah dan biji juwet telah berhasil dilakukan menggunakan metode Doyle & Doyle (1987) dengan modifikasi. Berdasarkan hasil uji kualitatif (gambar 4.6), menunjukkan hasil visualisasi DNA genom dari isolat fungi endofit buah dan biji juwet.

DNA genom fungi endofit isolat F1, F2, S1, S2, S3 memiliki panjang lebih dari 10000 *base pair*. Kelima isolat memiliki *band* yang tebal dan jelas, namun pada isolat S2 dan S3 memiliki *smear* yang tipis. Menurut Skutkova (2013) menjelaskan *smear* pada hasil elektroforesis DNA disebabkan adanya presipitasi protein dan sisa-sisa residu hasil isolasi DNA.



Gambar 4.6 Hasil elektroforesis menggunakan konsentrasi agar 1% (100 volt, 30 menit). **M**) marker, **F1**) isolat F1, **F2**) isolat F2, **S1**) isolat S1, **S2**) isolat S2, **S3**) isolat S3

Hasil uji kualitatif ini dapat dibandingkan dengan hasil uji kuantitatif. Berdasarkan hasil uji kuantitatif DNA genom isolasi fungi endofit dari buah dan

biji juwet memiliki nilai kemurnian dan kadar konsentrasi yang berbeda-beda (tabel 4.2). Kelima isolat memiliki nilai konsentrasi yang tinggi. Hal inilah yang menyebabkan band yang terbentuk memiliki bentuk yang jelas dan tebal (gambar 4.6).

Tabel 4.2 Hasil uji kuantitatif isolasi DNA fungi endofit buah dan biji juwet

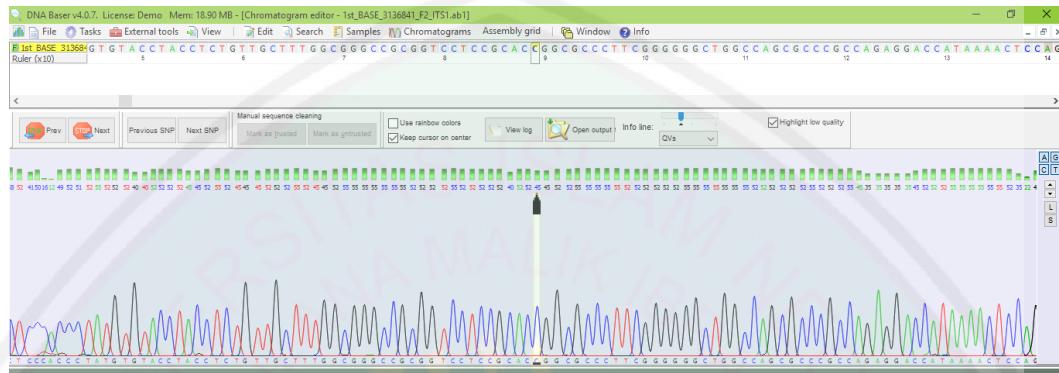
No	Isolat	Abs 260	Abs 280	260/280	Konsentrasi (ng/ul)
1.	F1	42.38	22.24	1.91	2119.1
2.	F2	10.32	5.17	2.00	516.19
3.	S1	27.49	14.96	1.84	1374.5
4.	S2	37.27	21.41	1.74	1863.5
5.	S3	22.76	13.49	1.69	1138.0

Pada isolat F1, F2, dan S1 memiliki nilai DNA yang murni. Hal ini sesuai literatur Sambrook (2006) menjelaskan rasio nilai kemurnian DNA pada absorbansi A_{260}/A_{280} adalah antara 1.8 – 2.0. Nilai DNA genom murni ini menyebabkan DNA tidak memiliki smear. Pada isolat S2 dan S3 memiliki nilai absorbansi $A_{260}/A_{280} < 1.8$. Menurut Glasel (1994) menjelaskan pada absorbansi A_{260}/A_{280} dengan nilai kemurnian < 1.8 adalah kontaminasi protein dan residu lainnya. Hal ini yang menyebabkan hasil visualisasi DNA genom isolat S2 dan S3 memiliki smear.

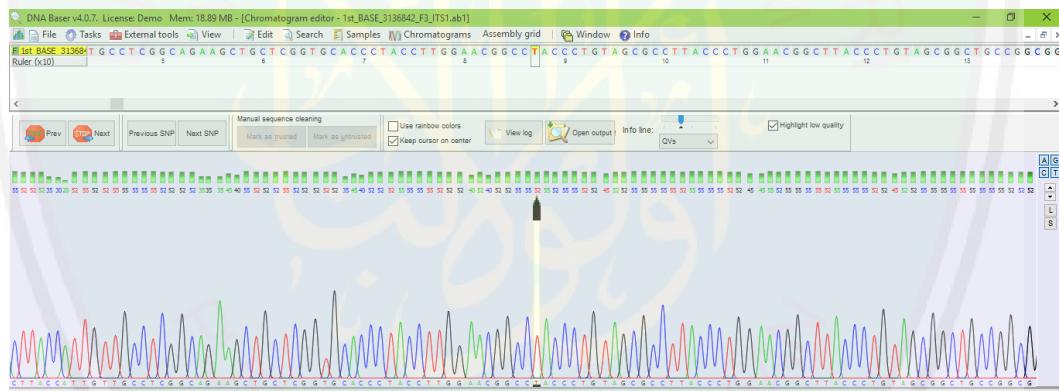
Lampiran 5

Hasil Sequence Scanner

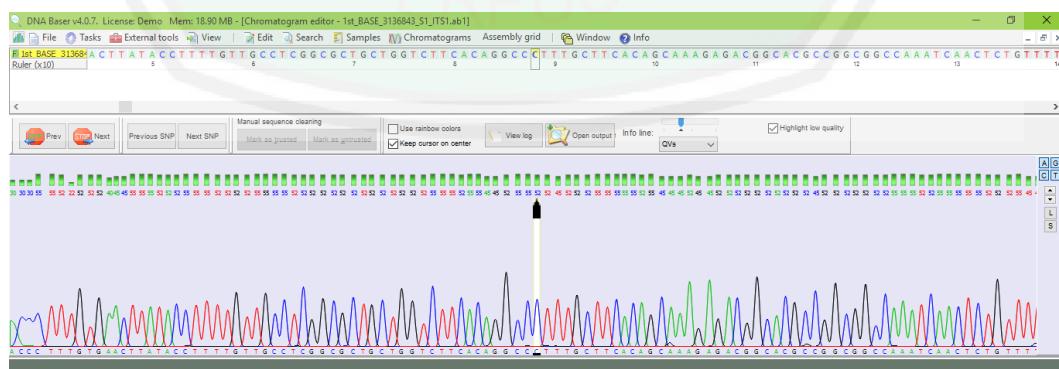
A. Isolat F1



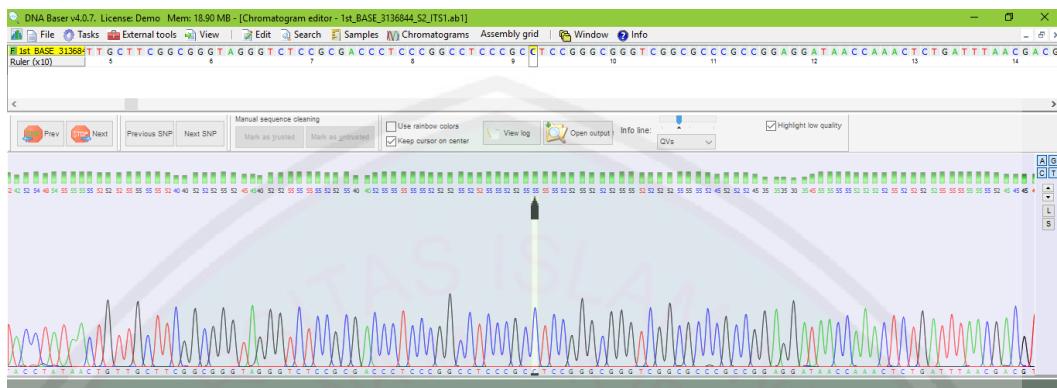
B. Isolat F2



C. Isolat S1



D. Isolat S2



E. Isolat S3



Lampiran 6

Jarak Genetik

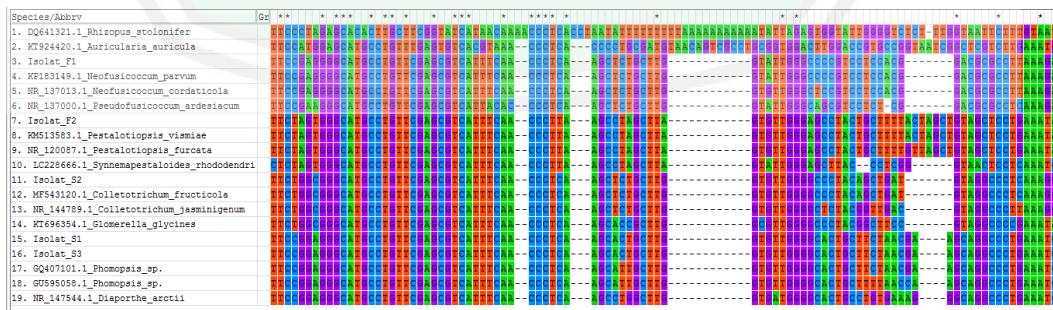
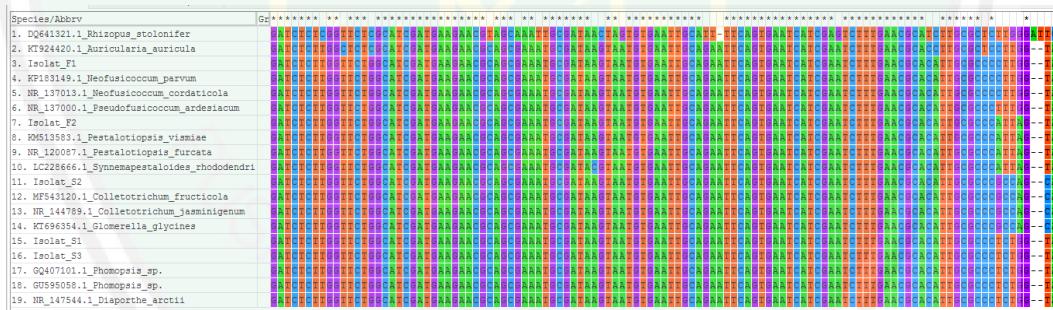
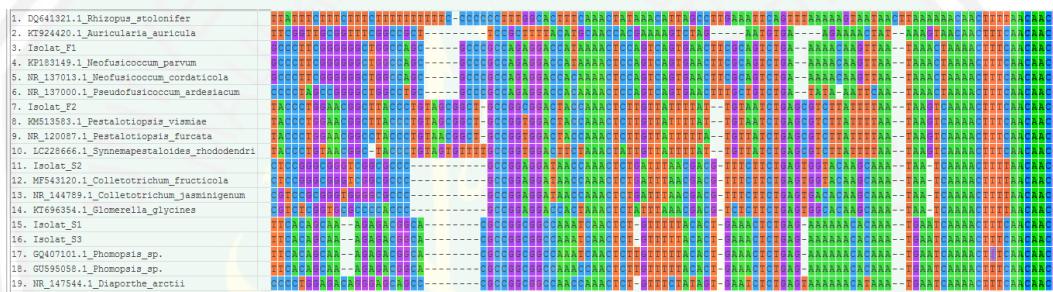
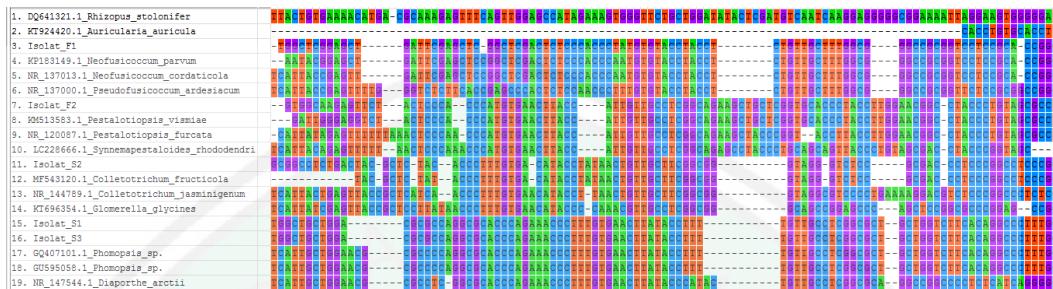
No	Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	DQ641321_1_Rhizopus_stolonifer																		
2	KT924420_1_Auricularia_auricula	0,440																	
3	Isolat_F1	0,451	0,328																
4	KP183149_1_Neofusicoccum_parvum	0,451	0,328	0,000															
5	NR_137013_1_Neofusicoccum_cordatico	0,453	0,325	0,011	0,011														
6	NR_137000_1_Pseudofusicoccum_ardes	0,445	0,355	0,064	0,064	0,067													
7	Isolat_F2	0,429	0,341	0,243	0,243	0,237	0,248												
8	KM513583_1_Pestalotiopsis_vismiae	0,429	0,339	0,243	0,243	0,237	0,248	0,003											
9	NR_120087_1_Pestalotiopsis_furcata	0,437	0,344	0,251	0,251	0,245	0,251	0,019	0,016										
10	LC228666_1_Synnemapestaloides_rhodc	0,440	0,357	0,261	0,261	0,261	0,259	0,075	0,072	0,077									
11	Isolat_S2	0,432	0,371	0,256	0,256	0,253	0,259	0,213	0,213	0,216	0,251								
12	MF543120_1_Colletotrichum_fructicola	0,432	0,371	0,256	0,256	0,253	0,259	0,213	0,213	0,216	0,251	0,000							
13	NR_144789_1_Colletotrichum_jasminiger	0,429	0,352	0,251	0,251	0,248	0,259	0,213	0,213	0,216	0,253	0,045	0,045						
14	KT696354_1_Glomerella_glycines	0,440	0,368	0,256	0,256	0,253	0,264	0,224	0,224	0,224	0,253	0,080	0,080	0,091					
15	Isolat_S1	0,443	0,365	0,253	0,253	0,253	0,261	0,235	0,237	0,237	0,267	0,197	0,197	0,219	0,216				
16	Isolat_S3	0,445	0,368	0,256	0,256	0,256	0,264	0,237	0,240	0,240	0,269	0,203	0,203	0,221	0,221	0,005			
17	GU595058_1_Phomopsis_sp.	0,435	0,363	0,261	0,261	0,269	0,235	0,237	0,237	0,272	0,203	0,203	0,219	0,227	0,011	0,016			
18	NR_147544_1_Diaporthe_arctii	0,453	0,360	0,267	0,267	0,264	0,264	0,219	0,221	0,224	0,251	0,211	0,211	0,224	0,224	0,099	0,104	0,091	

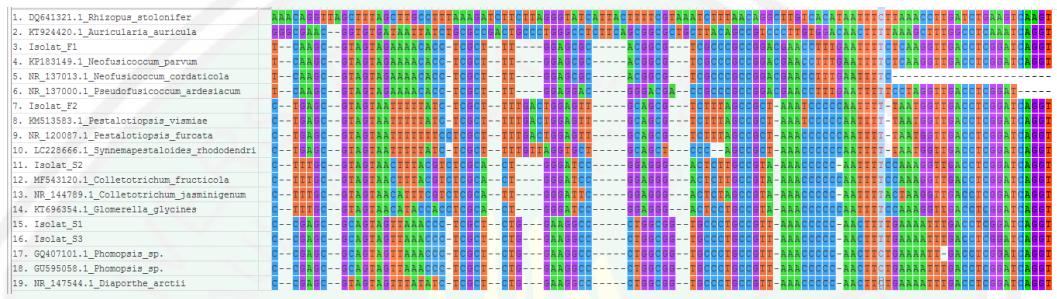
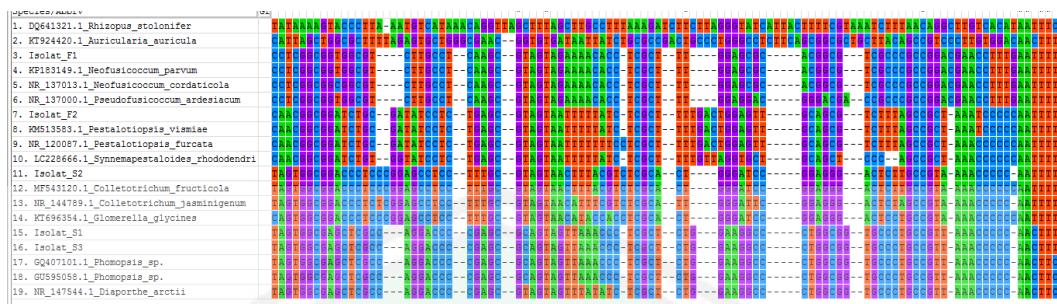
Similaritas

No	Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	DQ641321_1_Rhizopus_stolonifer																		
2	KT924420_1_Auricularia_auricula	56,00																	
3	Isolat_F1	54,93	67,20																
4	KP183149_1_Neofusicoccum_parvum	54,93	67,20	100,00															
5	NR_137013_1_Neofusicoccum_cordatico	54,67	67,47	98,93															
6	NR_137000_1_Pseudofusicoccum_ardes	55,47	64,53	93,60	93,60	93,33													
7	Isolat_F2	57,07	65,87	75,73	75,73	76,27	75,20												
8	KM513583_1_Pestalotiopsis_vismiae	57,07	66,13	75,73	75,73	76,27	75,20	99,73											
9	NR_120087_1_Pestalotiopsis_furcata	56,27	65,60	74,93	74,93	75,47	74,93	98,13	98,40										
10	LC228666_1_Synnemapestaloides_rhodc	56,00	64,27	73,87	73,87	73,87	74,13	92,53	92,80	92,27									
11	Isolat_S2	56,80	62,93	74,40	74,40	74,67	74,74	78,67	78,67	78,40	74,93								
12	MF543120_1_Colletotrichum_fructicola	56,80	62,93	74,40	74,40	74,67	74,13	78,67	78,67	78,40	74,93	100,00							
13	NR_144789_1_Colletotrichum_jasminiger	57,07	64,80	74,93	74,93	75,20	74,13	78,67	78,67	78,40	74,67	95,47	95,47						
14	KT696354_1_Glomerella_glycines	56,00	63,20	74,40	74,40	74,67	73,60	77,60	77,60	74,67	92,00	92,00	90,93						
15	Isolat_S1	55,73	63,47	74,67	74,67	74,67	73,87	76,53	76,27	76,27	73,33	80,27	80,27	78,13	78,40				
16	Isolat_S3	55,47	63,20	74,40	74,40	74,40	73,60	76,27	76,00	76,00	73,07	79,73	79,73	77,87	77,87	99,47			
17	GU595058_1_Phomopsis_sp.	56,53	63,73	73,87	73,87	73,87	73,07	76,53	76,27	76,27	72,80	79,73	79,73	78,13	77,33	98,93	98,40		
18	NR_147544_1_Diaporthe_arctii	54,67	64,00	73,33	73,33	73,60	73,60	78,13	77,87	77,60	74,93	78,93	78,93	77,60	77,60	90,13	89,60	90,93	

Lampiran 7

Pensejajaran Allignment





Lampiran 8

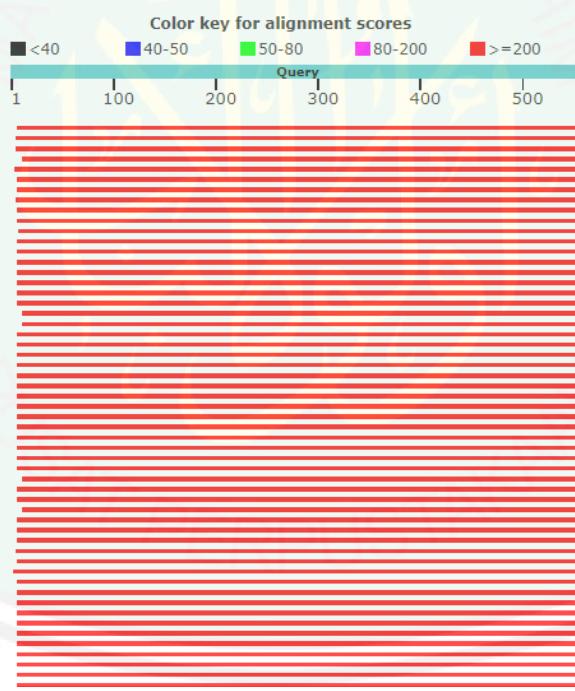
Isolat F1

A. Hasil sequensing

>F1

```
TGGCTCGGAGCTGATTGAGCTCGGCTCGACTCTCCACCCATGTGTACCTACCTCTG
TTGCTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCACCGCGCCCTCGGGGGCTGCCAGCGCC
CGCCAGAGGACCATAAAACTCCAGTCAGTGAACCTCGCAGTCTGAAAAACAAGTTAAT
AAAATCAAACACGGATCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCAAGCTGAGCGTCAATCATCGAATCTTGAAACGCAC
ATTGCGCCCCCTGGTATTCCGAGGGGCATGCCGTTCTGGAGCGTCAATTCAACCCCTCAAG
CTCTGCTGGTATTGGGCCCGTCCACGGACGCCCTAAAGACCTCGCTTGGAGCGCACGGCGTCGCCGC
CGTCTGCCTCAAGCGTAGTAGAAAACACCTCGCTTGGAGCGCACGGCGTCGCCGC
CGGACGAACCTTGAATTATTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGC
TGAACCTAACATCAATAAGCCGGAGGAAGAG
```

B. Grafik hasil blast isolat F1



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
✓	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate WH-15710 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large subunit ribosomal RNA gene	1007	1007	98%	0.0	99%	KY111851.1
✓	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate SCDV3-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1003	1003	98%	0.0	99%	KP183149.1
✓	<i>Neofusicoccum parvum</i> strain 4 ITS1 G11_1Q internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1003	1003	98%	0.0	99%	KF233982.1
✓	<i>Neofusicoccum parvum</i> strain P11 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1000	1000	97%	0.0	99%	KX648507.1
✓	<i>Neofusicoccum parvum</i> strain CCL7 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large subunit ribosomal RNA gene	1000	1000	98%	0.0	99%	KX347466.1
□	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate MHT-60 internal transcribed spacer, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1000	1000	98%	0.0	99%	KJ381072.1
□	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate EL64_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	998	998	98%	0.0	99%	KY053039.1
□	<i>Neofusicoccum parvum</i> strain xuanlingmy2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	998	998	98%	0.0	99%	KP140964.1
□	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate PEI23 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	996	996	98%	0.0	99%	KY053054.1
□	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate MT741 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	996	996	98%	0.0	99%	KY052955.1
□	<i>Neofusicoccum parvum</i> isolate Ton-K7-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large subunit ribosomal RNA gene	996	996	98%	0.0	99%	MF925483.1
□	Fungal endophyte strain SV1876 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	996	996	98%	0.0	99%	KY765283.1
□	Fungal endophyte strain SV1875 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	996	996	98%	0.0	99%	KY765282.1
□	Fungal endophyte strain SV1851 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	996	996	98%	0.0	99%	KY765285.1

Lampiran 9

Isolat F2

A. Hasil Sequensing

GTGGCAAGAGTTCTACTCCCACCCATGTGAACCTACCATTGTTGCCCTGGCAGAAGCTG
 CTCGGTGCACCCCTACCTGGAACGGCTACCCCTGTAGCGCCTACCCCTGGAACGGCTTA
 CCCTGTAGCGGCTGCCGGCGACTACCAAACCTCTGTTATTTATTGTAATCTGAGCGT
 CTTATTTAATAAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAG
 AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCACTGAGATCATGAATCT
 TTGAACGCACATTGCCCTAGCTTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTGAGCGCTATTIC
 AACCTTAAGCCTAGCTTAGTGTGGGAGCCTACTGCTTTACTAGCTGTAGCTCCTGA
 AATACAACGGCGATCTCGATATCCTCTGAGCGTAGTAATTTATCTCGTTTGAC
 TGGAGTTGCAGCGTCTTAGCCGCTAAATCCCCAATTTAATGGTTGACCTCGGATC
 AGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAACGATATCATAAGCCGGAGGAAGAG

B. Grafik hasil blast isolat



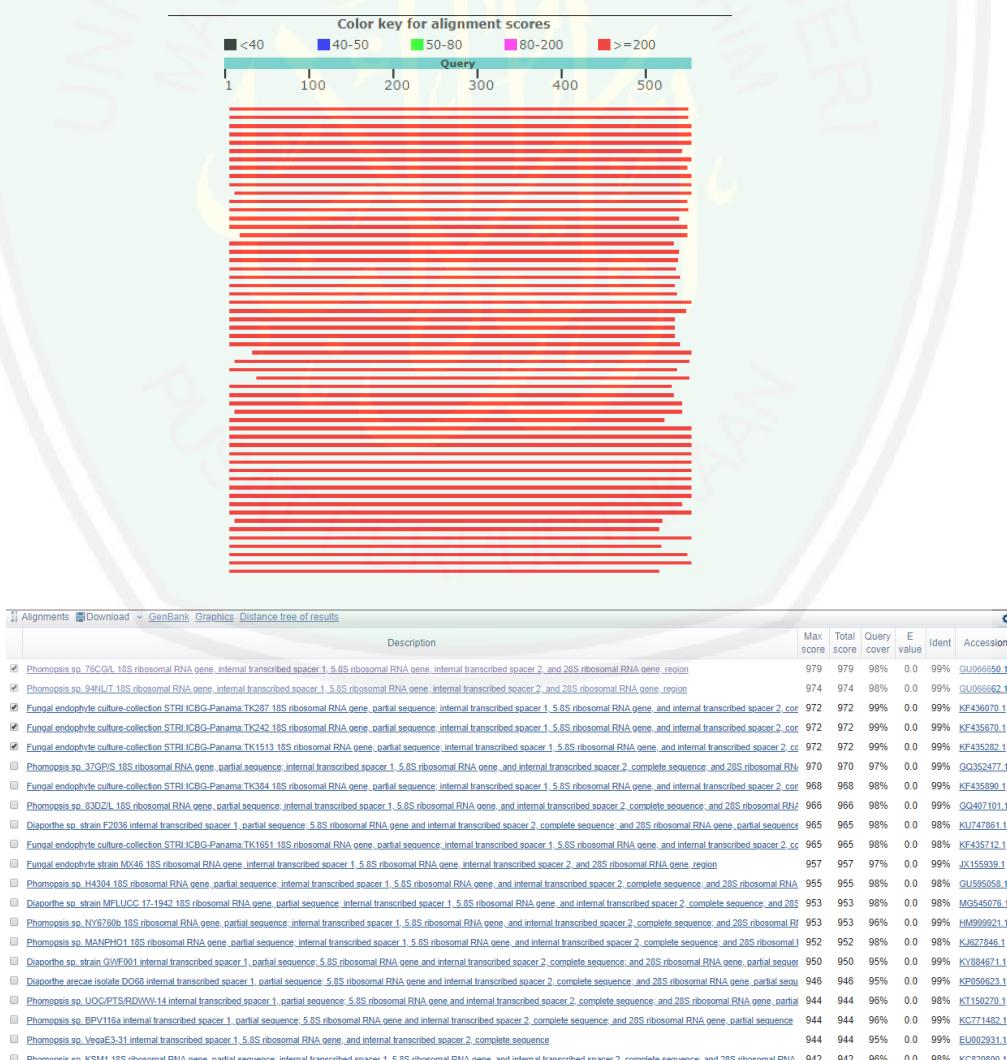
Lampiran 10

Isolat S1

A. Hasil Sequensing

GTGGCTGCTGGACGCCAGGCGCACCAAGAAACCCTTGTGAACTTACCTTTGTT
 GCCTCGCGCTGCTGGTCTTCACAGGCCCTTGCTTCACAGCAAAGAGACGGCACGCC
 GGCAGCCAAATCAACTCTGTTTACACTGAAACTCTGAGAAAAAACACAAATGAATC
 AAAACTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAGCGAAATGC
 GATAAGTAATGTGAATTGAGAATTCACTGAAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGC
 GCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCGTTGAGCGTCATTCAACCCCTCAAGCACTG
 CTTGGTGTGGGGCACTGCTTAACGAAGCAGGCCCTGAAATCTAGTGGCAGCTCG
 CCAGGACCCCCGAGCGCAGTAGTTAAACCCCTCGCTCTGGAAGGCCCTGGCGGTGCCCTG
 CCGTTAAACCCCCAACTTTGAAAATTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAA
 CTAAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAAG

B. Grafik hasil blast isolat S1



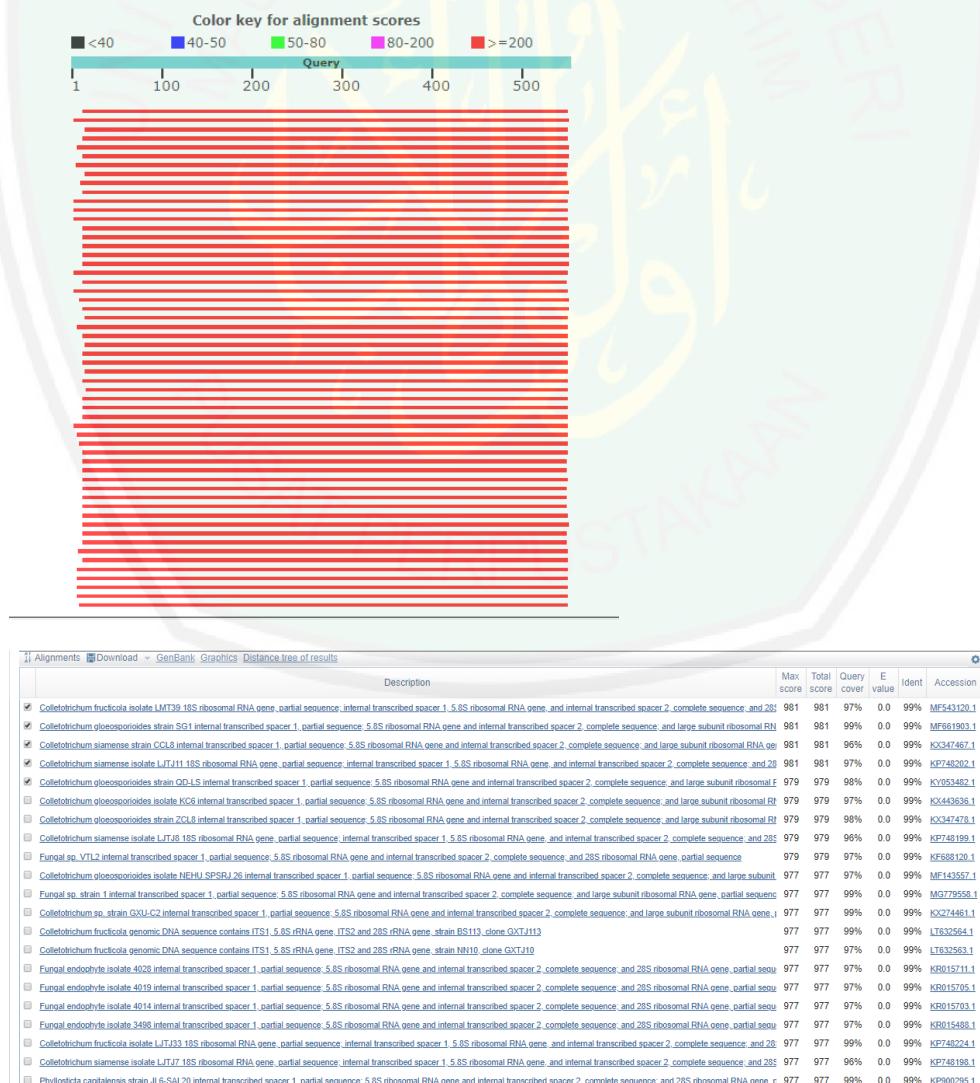
Lampiran 11

Isolat S2

A. Hasil Sequensing

GCAGGCTCTGACTACGCTCTACACCCTTGACATACCTATAACTGTTGCTCGGCCGGTAGGG
 TCTCCGCGACCCCTCCCGCCTCCCGCCTCCGGCGGGTCGGCGCCGCCGGAGGATAACCAAAC
 TCTGATTAAACGACGTTCTTCTGAGTGGTACAAGCAAATAATCAAAACTTTAACACGGATCT
 CTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCA
 GTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCGCCAGCATTCTGGCGGGCATGCCTGTTCG
 AGCGTCATTCAACCCCAAGCTCTGCTTGGTGGGGCCCTACAGCTGATGTAGGCCCTCAAA
 GGTAGTGGCGGACCCCTCCGGAGCCTCCTTGCCTAGTAACTTACGTCTCGCACTGGATCCG
 GAGGGACTCTGCCGAAAACCCCCAATTTCAAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACC
 CGCTGAACCTAACATATCAATAAGGCAGGAAACA

B. Grafik hasil blast isolat S2



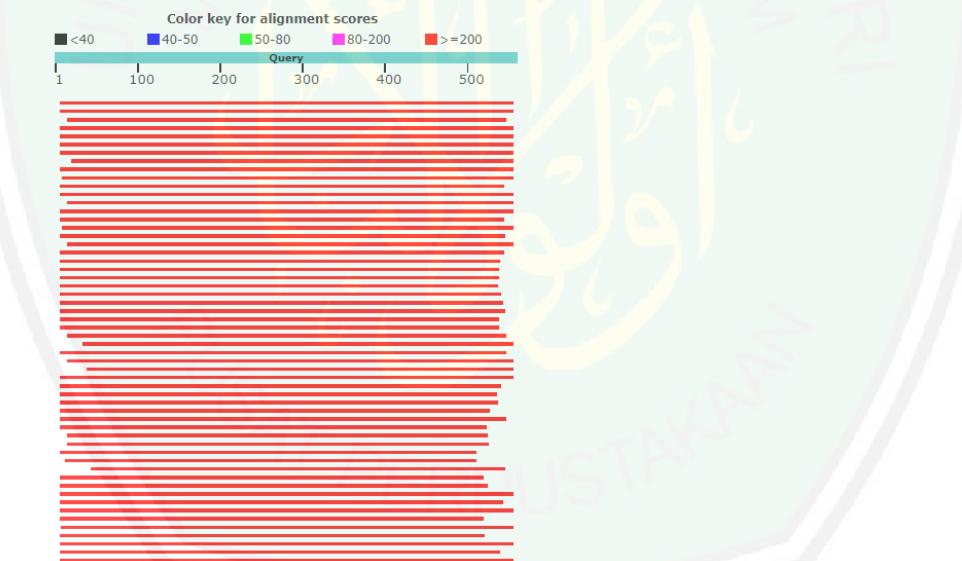
Lampiran 12

Isolat S3

A. Hasil Sequensing

```
TTGGGCCTGCTGGAGCGCCAGGCGCACCCAGAACCTTGTGAACCTACCTTTGTTGCCTG
GCGCTGCTGGTCTTCACAGGCCCTTGCTTCACAGCAAAGAGACGGCACGCCGGCGCAAATC
AACTCTTGTCCCCACTGAAACTCTGAGAAAAAACACAAATGAATCAAACATTCAACAAACGGA
TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT
TCAGTGAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTCAACCCTCAAGCACTGCTTGGTGTGGGCACTGCTTAACGAAGCAGGCC
CTGAAATCTAGTGGCGAGCTGCCAGGACCCGAGCGCAGGAGTTAACCTCGCTGTGGAAG
GCCCTGGCGGTGCCCTGCCGTTAAACCCCCAACCTTGAACCTCGGATCAGGGAGGA
ATACCCGCTGAGCTTAAGCATATCAATAAGCCTGAGGAAATCCT
```

B. Grafik hasil blast isolat S1



	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
1	<i>Phomopsis</i> sp. 76CG1_18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, region	933	933	97%	0.0	97%	GU666550_1
2	<i>Phomopsis</i> sp. 33D2L_18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	931	931	97%	0.0	97%	QQ407101_1
3	<i>Phomopsis</i> sp. 370P/18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	931	931	95%	0.0	98%	QD352477_1
4	<i>Phomopsis</i> sp. 94H/LT_18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, region	929	929	97%	0.0	97%	GU666862_1
5	Fungal endophyte culture-collection STRI/ICBG-Panama/TK287_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, cor	924	924	98%	0.0	97%	KF36070_1
6	Fungal endophyte culture-collection STRI/ICBG-Panama/TK42_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, cor	924	924	98%	0.0	97%	KF35670_1
7	Fungal endophyte culture-collection STRI/ICBG-Panama/TK1513_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, cor	924	924	98%	0.0	97%	KF352382_1
8	<i>Diaerthea</i> sp. strain GHVF001 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequen	922	922	95%	0.0	98%	KV844671_1
9	<i>Phomopsis</i> sp. H4504_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	922	922	97%	0.0	97%	GU595958_1
10	Fungal endophyte culture-collection STRI/ICBG-Panama/TK384_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, cor	920	920	97%	0.0	97%	KF353590_1
11	<i>Phomopsis</i> sp. NV6760B_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	920	920	95%	0.0	98%	HM999921_1
12	<i>Diaporthe</i> sp. strain MFLUCC-17-1942_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	918	918	97%	0.0	97%	MS45970_1
13	Fungal endophyte culture-collection STRI/ICBG-Panama/TK1651_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, co	918	918	96%	0.0	97%	KF35712_1
14	<i>Phomopsis</i> sp. MANPH01_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	918	918	97%	0.0	97%	KJ627846_1
15	<i>Phomopsis</i> sp. UOG/PTS/ROWW-14 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial	917	917	95%	0.0	97%	KT50270_1
16	<i>Diaporthe</i> sp. strain F2036 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	915	915	97%	0.0	97%	KU747481_1
17	<i>Phomopsis</i> sp. KSM1_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	913	913	96%	0.0	97%	KC20690_1
18	Fungal endophyte strain MX46_18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene, region	913	913	96%	0.0	97%	JX155939_1
19	<i>Phomopsis</i> sp. G39-1C_18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA	911	911	95%	0.0	97%	FJ37768_1
20	<i>Phomopsis</i> sp. VegaE3-31 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	911	911	94%	0.0	98%	EU02031_1



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : NADA ASMARA HANIN
NIM : 14620022
Program Studi : SI BIOLOGI
Semester : GENAP TA 2018
Pembimbing : PRILYA DEWI FITRIASARI, M.Sc.
Judul Skripsi : IDENTIFIKASI FUNGI ENDOFIT DARI BUAH DAN BIJI JUWET (*Syzygium cumini* L.) Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi dan Analisis rDNA ITS

NO	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	06-11-2017	ACC Judul Skripsi	1.
2.	20-11-2017	Konsultasi BAB II	2.
3.	28-11-2017	Konsultasi BAB I	3.
4.	04-01-2018	Konsultasi BAB I dan BAB III	4.
5.	12-01-2018	Konsultasi BAB I dan BAB III	5.
6.	18-01-2018	Konsultasi BAB I dan BAB III	6.
7.	09-02-2018	Revisi BAB I, II dan III	7.
8.	16-02-2018	Revisi BAB I, II dan III	8.
9.	19-02-2018	Revisi BAB I, II dan III	9.
10.	27-02-2018	ACC proposal	10.
11.	08-03-2018	Konsultasi hasil data	11.
12.	15-03-2018	Konsultasi hasil data	12.
13.	05-04-2018	Konsultasi hasil data	13.
14.	18-04-2018	Konsultasi BAB IV	14.
15.	24-04-2018	Konsultasi BAB IV	15.
16.	30-04-2018	Konsultasi BAB IV	16.
17.	11-05-2018	Konsultasi BAB IV	17.
18.	16-05-2018	Konsultasi BAB IV	18.
19.	06-06-2018	Konsultasi BAB IV	19.
20.	-06-2018	ACC skripsi	20.

Malang, 2018

Pembimbing Skripsi,

Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc
NIDT. 19900428 20160801 2 062

Ketua Jurusan,

Romaidi, M. Si., D. Sc
NIP. 19810201 200901 1 019





**KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id**

KARTU KONSULTASI AGAMA SKRIPSI

Nama : Nada Asmara Hanin
 NIM : 14620022
 Program Studi : SI BIOLOGI
 Semester : GENAP TA 2018
 Pembimbing : Mujahidin Ahmad, M.Sc.
 Judul Skripsi : Identifikasi Fungi Endofit Dari Buah Dan Biji Juwet (Syzygium cumini L.) Skeels Berdasarkan Karakter Morfologi dan Analisis rDNA ITS

NO	TANGGAL	URAIAN KONSULTASI	TTD PEMBIMBING
1.	05-01-2018	Konsultasi BAB I	1. <i>[Signature]</i>
2.	15-01-2018	Revisi BAB I, II	2. <i>[Signature]</i>
3.	25-01-2018	Revisi BAB I dan II	3. <i>[Signature]</i>
4.	26-01-2018	Revisi BAB I dan II	4. <i>[Signature]</i>
5.	01-02-2018	Revisi BAB I dan II	5. <i>[Signature]</i>
6.	07-02-2018	Revisi BAB I dan II	6. <i>[Signature]</i>
7.	14-02-2018	ACC Bab I dan II	7. <i>[Signature]</i>
8.	24-05-2018	Konsultasi BAB IV	8. <i>[Signature]</i>
9.	31-05-2018	Revisi BAB IV	9. <i>[Signature]</i>
10.	07-05-2018	ACC BAB IV	10. <i>[Signature]</i>

Malang, 2018

Pembimbing Agama Skripsi,

Mujahidin Ahmad, M.Sc
NIDT. 19860512 20160801 1 060

Ketua Jurusan,



Romaidi, M. Si., D. Sc
NIP. 19810201 200901 1 019