

**IDENTIFIKASI MOLEKULER JAMUR ISOLAT BATU BARA
BERDASARKAN SEKUEN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBE SPACER*
(ITS)**

SKRIPSI

**Oleh:
MUHAMMAD SHOBIHUL KHOIR
NIM. 13630009**



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

**IDENTIFIKASI MOLEKULER JAMUR ISOLAT BATU BARA
BERDASARKAN SEKUEN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBE SPACER*
(ITS)**

SKRIPSI

**Oleh:
MUHAMMAD SHOBIHUL KHOIR
NIM. 13630009**

**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)**

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

**IDENTIFIKASI MOLEKULER JAMUR ISOLAT BATU BARA
BERDASARKAN SEKUEN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBE SPACER*
(ITS)**

SKRIPSI

**Oleh:
MUHAMMAD SHOBIHUL KHOIR
NIM. 13630009**

**Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal : 17 Oktober 2018**

Pembimbing I



**Akyunul Jannah, S.Si, M.P
NIP. 19750410 200501 2 009**

Pembimbing II



**Susi Nurul Khalifah, M.Si
NIDT. 19851020 20180201 2 240**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP.19790620 200604 2 002**

**IDENTIFIKASI MOLEKULER JAMUR ISOLAT BATU BARA
BERDASARKAN SEKUEN DAERAH *INTERNAL TRANSCRIBE SPACER*
(ITS)**

SKRIPSI

**Oleh:
MUHAMMAD SHOBIHUL KHOIR
NIM. 13630009**

**Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 17 Oktober 2018**

Penguji Utama	: Elok Kamilah Hayati, M.Si NIP. 19790620 200604 2 002	(.....)
Ketua Penguji	: Dewi Yuliani, M.Si NIDT. 19880711 20160801 2 067	(.....)
Sekretaris Penguji	: Akyunul Jannah, S.Si, M.P NIP. 19750410 200501 2 009	(.....)
Anggota Penguji	: Susi Nurul Khalifah, M.Si NIDT. 19851020 20180201 2 240	(.....)

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia**



**Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002**

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Muhammad Shobihul Khoir
NIM : 13630009
Jurusan : Kimia
Fakultas : Sains dan Teknologi
Judul Penelitian : Identifikasi Molekuler Jamur Isolat Batu Bara
Berdasarkan Sekuen Daerah *Internal Transcribe Spacer*
(ITS)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan, atau gagasan orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa skripsi saya ini hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas hal tersebut.

Malang, 15 Oktober 2018
Yang membuat pernyataan,



Muhammad Shobihul Khoir
NIM. 13630009

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Wr. Wb.

Puji syukur kepada Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat, ni'mat dan Taufiq-Nya kepada penulis sehingga Skripsi yang berjudul: **“Identifikasi Molekuler Jamur Isolat Batubara Berdasarkan Sekuen Daerah *Internal Transcribe Spacer (ITS)*”** dapat terselesaikan. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membimbing umat ke jalan yang benar melalui agama islam.

Terimakasih tidak lupa penulis ucapkan kepada pihak-pihak yang telah membantu terselesaikannya Skripsi ini khususnya kepada :

1. Kedua orang tua, Bapak Nur Choib dan Ibu Nur Jannah yang senantiasa mendukung dan mendoakan penulis.
2. Ibu Hj Akyunnul Jannah, S.Si, M.P selaku Pembimbing I, Ibu Susi Nurul Khalifah, M.Si selaku Pembimbing II, dan Ibu Dewi Yuliani, M.Si selaku konsultan yang senantiasa memberi saran kepada penulis.
3. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Penguji dan Ketua Jurusan Kimia UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Seluruh dosen dan laboran yang telah memberikan ilmu, wawasan, dan pengalaman selama penulis belajar di lingkungan Jurusan Kimia.
5. Teman-teman seperjuangan yang senantiasa memotivasi penulis untuk segera menyelesaikan penyusunan Skripsi ini.

Semoga segala kebaikan dibalas oleh Allah SWT dengan balasan yang jauh lebih baik. Penulis menyadari bahwa Skripsi ini masih banyak kekurangan. Saran dan koreksi sangat penulis harapkan untuk perbaikan-perbaikan selanjutnya. Semoga Skripsi ini bermanfaat bagi pembaca dan bagi penulis khususnya.

*Amiin Ya Rabbal 'Alamiin.
Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 24 Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
ABSTRAK	x
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan	5
1.4 Batasan Masalah	5
1.5 Manfaat	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Jamur	6
2.2 Gen Daerah <i>Internal Transcribe Spacer</i> (ITS) DNA Ribosomal	8
2.3 Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl	10
2.4 Elektroforesis Gel Agarosa	12
2.5 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	13
2.6 DNA menurut Al-Quran	14
BAB III METODE PENELITIAN	16
3.1 Pelaksanaan Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan	16
3.2.1 Alat	16
3.2.2 Bahan	16
3.3 Tahapan Penelitian	17
3.4 Cara Kerja	18
3.4.1 Pembuatan Media Tumbuh Jamur (PDA)	18
3.4.2 Isolasi Jamur dari Batubara	18
3.4.3 <i>Screening</i> Jamur Selulolitik	18
3.4.4 <i>Screening</i> Jamur Amilolitik	19
3.4.5 Pengamatan Morfologi	19
3.4.6 Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl	19
3.4.7 Elektroforesis Gel Agarose	20
3.4.8 Amplifikasi Gen Daerah ITS	21
3.4.9 Sekuensing DNA	21
3.4.10 Analisis Bioinformatika	22
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	23

4.1 Isolasi Jamur	23
4.2 Uji Aktifitas Enzim	24
4.3 Pengamatan Morfologi Jamur	25
4.4. Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl	26
4.5 Amplifikasi Sekuen Daerah ITS	27
4.6 Analisis Bioinformatika	28
4.7 Kajian DNA dalam Prespektif Al-Quran	31
BAB V PENUTUP.....	33
5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN.....	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Bentuk sel jamur genus (a) <i>Aspergillus</i> , (b) <i>Penicillium</i> , (c) <i>Paecilomyces</i> , (d) <i>Candida</i> , (e) <i>Cladosporium</i> , dan (f) <i>Trichoderma</i> ribosomal	7
Gambar 2.2 Urutan daerah ITS1 dan ITS2 pada DNA ribosomal	8
Gambar 2.3 Sekuen lengkap ITS rDNA <i>Trichoderma</i> , sebagian 18S rDNA (merah), ITS1 (hijau), 5,8S rDNA (hitam), ITS2 (biru), sebagian 28S rDNA (kuning)	9
Gambar 2.4 (a) Interaksi CTAB dengan lemak dan protein membentuk misel (Chin, 2015). (b) Interaksi antara muatan negative DNA dengan NaCl	12
Gambar 2.5 Hasil Elektroforesis gel agarosa DNA metode CTAB/NaCl	13
Gambar 2.6 Skema reaksi PCR (a) Denaturasi DNA, (b) Penempelan primer, (c) Pemanjangan primer	14
Gambar 4.1 Isolat jamur dari batu bara (a) isolat A BTBR, dan (b) isolat K BTBR	23
Gambar 4.2 Uji aktifitas enzim selulase (A1 dan K1) dan enzim amilase (A2 dan K2) pada isolat A (A1 dan A2), dan isolat K (K1 dan K2).....	24
Gambar 4.3 Pengamatan morfologi isolat A BTBR dengan perbesaran 40x	25
Gambar 4.4 Hasil elektroforesis gel agarose sampel isolasi DNA isolat A metode CTAB/NaCl (U1, U2, U3 adalah ulangan 1, ulangan 2, dan ulangan 3)	26
Gambar 4.5 (a) Marker Vivantis VC 100 bp, (b) Visualisasi gel agarosa. M : marker VC 100 bp, A : produk amplifikasi sekuen ITS isolat A BTBR	28
Gambar 4.6 Sekuen ITS isolat A BTBR jamur dari batu bara	28
Gambar 4.7 Hasil analisis filogenetik isolat A BTBR dari batu bara	29

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Sekuen Pasangan Primer ITS1-ITS4 dan ITS5-ITS4	9
--	---



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	39
Lampiran 2 Diagram Alir.....	40
Lampiran 3 Perhitungan Bahan	44
Lampiran 4 Data Pengamatan	47
Lampiran 5 Data <i>Pairwise Distance</i>	48
Lampiran 6 Kromatogram Sekuensing	49
Lampiran 7 Allignment Sekuen Isolat A BTBR	51

ABSTRAK

Khoir, M.S. 2018. **Identifikasi Molekuler Jamur Isolat Batu Bara Berdasarkan Sekuen Daerah *Internal Transcribe Spacer* (ITS).** Pembimbing I: Akyunul Jannah, S.Si. M.P; Pembimbing II: Susi Nurul Khalifah, M.Si; Konsultan: Dewi Yuliani, M.Si.

Jamur merupakan mikroorganisme dengan keanekaragaman tinggi yang banyak ditemukan di air dan tanah, termasuk pada batu bara. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jenis jamur yang diisolasi dari batu bara berdasarkan sekuen daerah ITS. Isolasi jamur dengan metode CTAB/NaCl dan diamplifikasi dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Amplifikasi sekuen daerah ITS menggunakan pasangan primer ITS5-ITS4. Pengamatan terhadap morfologi isolat A BTBR menunjukkan kemiripan dengan genus *Penicillium*. Isolasi DNA isolat A BTBR mendapatkan kemurnian 2,01 dengan konsentrasi 275,89 ng/μL. Sekuen daerah ITS isolat A BTBR hasil amplifikasi berukuran 592 pb. Isolat A BTBR memiliki *identity* tertinggi sebesar 94% dengan beberapa genus *Penicillium* berdasarkan BLASTn. Kerabat terdekat isolat A BTBR berdasarkan analisis filogenetik adalah *Penicillium sublateritium* JB841245.1 dengan *identity* sebesar 94,66%.

Kata Kunci : Jamur, batu bara, metode CTAB/NaCl, sekuen daerah ITS, *Penicillium*

ABSTRACT

Khoir, M.S. 2018. **Identification of Fungi Coal Isolate Based On Sequence Internal Transcribe Spacer Region (ITS)**. Supervisor I: Akyunul Jannah, S.Si, M.P; Supervisor II: Susi Nurul Khalifah, M.Si; Consultant: Dewi Yuliani, M.Si.

Fungi is a high-diversity microorganism founded in water and soil, including in coal. This study is an attempt to determine the kinds of fungi from coal based on the sequence of the ITS region. Isolated fungi using CTAB / NaCl method and amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction) method. Amplification sequence of the ITS region used ITS5-ITS4 of primer. Observation on the morphology of BTBR's isolate showed similarities with the genus *Penicillium*. Isolation of DNA from isolate A of BTBR was obtained 2.01 of purity and 275.89 ng/ μ L of the concentration. The ITS region sequence isolates A of BTBR resulted in 592 bp of length. Isolate A of BTBR has the highest identity of 94% with several *Penicillium* genus based on BLASTn. The closest relatives from isolate A of BTBR based on phylogenetic analysis was *Penicillium sublateritium* JX841245.1 with 94.66% of identity.

Keyword: Fungi, coal, CTAB/NaCl method, ITS region sequence, *Penicillium*

مستخلص البحث

خير. م.س. ٢٠١٨. توصيف الهوية الجزيئية من عزلات المشروم الفحمية بناء على تسلسلات إقليمية في فاصل النسخ الداخلي (*Internal Transcribe Spacer*). المشرف الأول: أعين الجنة، الماجستير. المشرف الثاني: سوسي نور الخليفة، الماجستير. المششارة: دوي يولياني، الماجستير.

المشروم من الكائنات الحية الدقيقة بتنوعها العالية والموجودة في المياه والتربة، بما في ذلك الفحم. كان الهدف من هذا البحث هو تحديد أنواع المشروم المعزولة من الفحم بناء على تسلسلات إقليمية في فاصل النسخ الداخلي. عزلات المشروم بطريقة CTAB/NaCl وتضخيمها بواسطة طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل (*Polymerase Chain Reaction*). استخدم تضخيم تسلسلات إقليمية في فاصل النسخ الداخلي مركبة أساسية مزدوجة ITS5-ITS4. وأشارت الملاحظة على مورفولوجية العزلات أ من BTBR إلى أوجه التشابه مع جنس بنسيليوم. حصلت عزلات الحمض النووي من العزلات أ من BTBR على نقاء بقدر ٢.١ بالتركيز ٢٧٥.٨٩ ng/μL. ثم تضخيم تتابع عزلات على تسلسلات إقليمية في فاصل النسخ الداخلي من العزلات أ من BTBR بمقدار ٥٩٢ فب. العزلات أ من BTBR لها الهوية الجزيئية العليا بمقدار ٩٤% مع العديد من جنس بنسيليوم بناء على BLASTn. أقرب العائلة من العزلات أ من BTBR حسب نتائج التحليل التطور الجزيئي هي بنسيليوم فطرية (*Penicillium sublateritium*) JB841245.1 بمقدار التوصيف ٩٤.٦٦%.

الكلمات الرئيسية: المشروم، الفحم، طريقة CTAB/NaCl، تسلسلات إقليمية في فاصل النسخ الداخلي، بنسيليوم (*Penicillium*)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Batu bara adalah batuan hidrokarbon dari jasad renik yang terpendam dalam tanah dengan suhu tinggi dan waktu lama (Nurhayati, dkk., 2013). Batu bara mengandung banyak karbon yang diperlukan oleh mikroorganisme sebagai nutrisi untuk pertumbuhan. Mikroorganisme memerlukan enzim tertentu untuk memanfaatkan bahan organik pada batubara (Aydogdu, dkk., 2012; Kashem, dkk., 2004; Metin, dkk., 2010; Yulistia, dkk., 2015).

Enzim yang banyak dihasilkan oleh mikroorganisme adalah enzim karbohidrase. Enzim karbohidrase meliputi glukase, selulase, amilase, laktase, diastase, invertase, pektinase, hemiselulase, dan xilanase (National Enzyme Company, 2012). Enzim karbohidrase banyak digunakan dalam industri pupuk organik, industri kertas, bioteknologi, tekstil, farmasi, dan bioetanol karena tidak menghasilkan limbah bahan beracun dan berbahaya (B3) (Metin, dkk., 2010; Rismijana, dkk., 2003; Rathnan, dkk., 2013; Deviani, dkk., 2014; Pakpahan, dkk., 2015). Jamur merupakan mikroorganisme yang banyak digunakan dalam memproduksi enzim karbohidrase (National Enzyme Company, 2012).

Allah SWT telah menciptakan bermacam-macam tumbuhan di bumi ini, sebagaimana firman-Nya dalam QS Thaha ayat 53. Setiap tumbuhan diciptakan dengan rupa dan bentuk yang berbeda sesuai dengan manfaat dari tumbuhan tersebut. Keanekaragaman ciptaan Allah SWT merupakan bukti atas kekuasaan Allah SWT. Jamur merupakan salah satu ciptaan Allah SWT yang memiliki

banyak jenis dan manfaat seperti menghasilkan enzim, membantu proses penguraian makhluk hidup yang telah mati.

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَلَكَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا
مِّن نَّبَاتٍ شَتَّىٰ

Artinya : Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, dan menurunkan dari langit air hujan. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dari tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam (QS Thaha : 53).

Penelitian Pitarini (2014) berhasil mengisolasi jamur dari batu bara yang memiliki aktifitas enzim selulase. Enzim selulase termasuk golongan enzim karbohidrase. Enzim karbohidrase meliputi glukonase, selulase, amilase, laktase, diastase, pectinase, invertase, hemiselulase, dan xilanase (National Enzyme Company, 2012). Jamur dari batubara tersebut kemungkinan juga memiliki aktifitas enzim amilase. Jamur yang diisolasi dari batu bara belum diidentifikasi secara fenotip dan genotip. Identifikasi ini perlu dilakukan untuk mengetahui jenis jamur yang terdapat pada batu bara. Identifikasi jenis jamur sangat penting untuk dilakukan karena diperkirakan ada 1,5 juta jenis jamur, tetapi kurang dari 5% yang telah teridentifikasi (Mueller, Bills, dan Foster, 2004; Mueller dan Schmit, 2007).

Identifikasi secara fenotip perlu dilakukan untuk mengetahui jenis jamur hasil isolasi dari batu bara dengan mengamati morfologi jamur. Hasil identifikasi fenotip perlu diklarifikasi dengan identifikasi genotip karena beberapa jenis jamur memiliki morfologi yang hampir sama (Rahayu, dkk, 2015). Identifikasi genotip dilakukan dengan analisis urutan gen daerah *Internal Transcribe Spacer* (ITS). Gen daerah ITS merupakan gen penyandi organisme eukariotik yang terdapat

diantara gen 18S, 5,8S, dan 28S rDNA. Gen daerah ITS yang akan diamplifikasi adalah daerah ITS1 yang berada diantara gen 18S dan 5,8S rDNA, dan daerah ITS2 yang terdapat diantara gen 5,8S dan 28S rDNA (Fujita, dkk., 2007; Mulyatni, dkk., 2011).

Gen daerah ITS dipilih untuk identifikasi genotip karena gen daerah ITS merupakan gen yang bersifat *variable* sehingga sekuen gen daerah ITS dari satu spesies yang sama akan memiliki sekuen yang beragam. Keberagaman ini memudahkan untuk identifikasi kekerabatan suatu spesies dengan membandingkan kemiripan sekuen gen daerah ITS. Alasan lain penggunaan gen daerah ITS karena gen daerah ITS adalah *noncoding sequence*. Ukuran sekuen daerah ITS juga tidak terlalu besar, sekitar 500-800 pb sehingga lebih mudah untuk diamplifikasi (Mulyatni, dkk., 2011; Nugroho, dkk., 2013; Purnamasari, dkk., 2012; Rahayu, dkk., 2015).

Identifikasi genotip dari jamur dimulai dengan isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan secara kimiawi menggunakan metode CTAB (*Cetyl trimethyl ammonium bromide*). Metode CTAB dipilih karena murah dan mudah serta DNA yang dihasilkan memiliki kualitas yang bagus (Fatchiyah, 2011). Jamsari (2008) mengisolasi jamur dengan metode CTAB dan hasil elektroforesis didapatkan pita DNA yang tebal. Mishra, Tripathi, dan Tiwari (2014) mengisolasi DNA jamur dengan metode CTAB dan mendapat pita DNA yang tebal tanpa smear. Umesha, Manukumar, dan Raghava (2016) membandingkan beberapa metode isolasi pada DNA jamur, dan hasil terbaik dengan metode CTAB yang telah dimodifikasi. DNA hasil isolasi diamplifikasi dengan metode reaksi polimerasi berantai (PCR).

Metode PCR menggunakan dua pasang primer untuk mengamplifikasi gen target. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen daerah ITS adalah pasangan primer ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') sebagai primer maju dan ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') sebagai primer mundur (Nugroho, dkk., 2013; Ristaino, dkk., 1998; Sandy, dkk., 2015; Sette, dkk., 2006; Yan-Lin, dkk., 2010). Primer ITS5 dan ITS4 dipilih untuk mengamplifikasi gen daerah ITS karena dapat mengamplifikasi sebagian gen daerah 18S sampai 28S dimana gen daerah ITS1 dan ITS2 terdapat diantaranya (Fujita, dkk., 2007; Mulyatni, dkk., 2011; Nugroho, dkk., 2013).

Amplifikasi DNA dengan pasangan primer ITS5 dan ITS4 berlangsung pada suhu 95°C untuk denaturasi DNA dari *double strand* menjadi *single strand*. Penempelan primer berlangsung pada suhu 55°C. Proses pemanjangan primer berlangsung pada suhu 72°C (Yan-Lin, dkk., 2010). DNA hasil amplifikasi disekuensing untuk menentukan urutan DNA pada sekuen daerah ITS jamur (Hert, dkk., 2008). Sekuen daerah ITS dianalisis kemiripannya dengan sekuen jamur lain pada *genbank* untuk mengetahui jenis jamur secara molekuler. Persentase kemiripan sekuen daerah ITS lebih dari 97% menunjukkan kekerabatan jamur hasil isolasi dari batu bara dengan jamur lain (Vu, dkk., 2016).

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana kekerabatan jamur hasil isolasi dari batu bara berdasarkan identifikasi genotip dengan jamur lain ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kekerabatan jamur hasil isolasi dari batu bara berdasarkan identifikasi genotip.

1.4 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah :

1. Sampel jamur diisolasi dari batu bara yang diambil dari PLTU Paiton Probolinggo.
2. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen daerah ITS adalah pasangan primer ITS5 sebagai primer maju dan ITS4 sebagai primer mundur.
3. Isolasi DNA jamur dari batu bara dilakukan dengan metode CTAB/NaCl.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi baru tentang jenis jamur pada batu bara untuk memperbanyak informasi terkait keanekaragaman jamur yang ada. Informasi tersebut dapat digunakan sebagai langkah awal bagi penelitian selanjutnya untuk menggali manfaat lebih banyak dari jamur tersebut.





BAB II

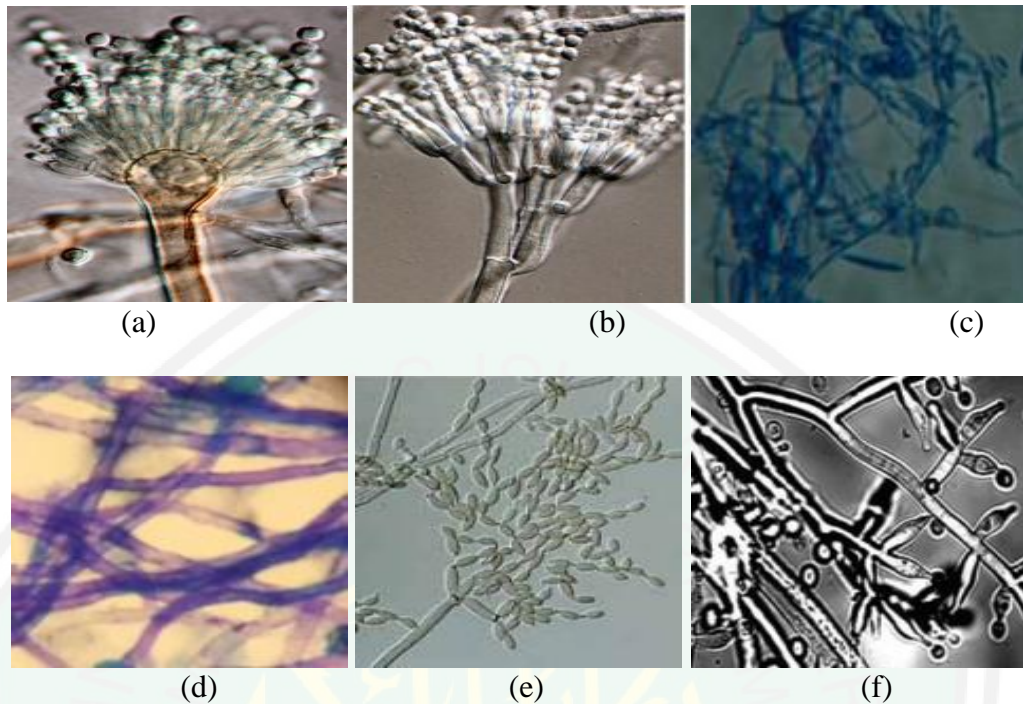
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jamur

Jamur (cendawan) merupakan mikroorganisme eukariotik (bersel banyak) heterotrofik, yaitu organisme yang memanfaatkan sisa-sisa makhluk hidup lain untuk pertumbuhannya. Jamur menguraikan bahan-bahan organik pada tanah atau bagian tubuh makhluk hidup lainnya menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana. Bahan-bahan organik yang terdapat di alam kebanyakan berupa polimer sehingga perlu didegradasi terlebih dahulu (Hanum dan Kuswytasari, 2014).

Jamur memegang peran penting dalam menjaga kesuburan tanah dan siklus karbon di biosfer (Santos, dkk., 2012; Kumar, dkk., 2012; Pakpahan, dkk., 2015). Jamur banyak terdapat di tanah, air, dan benda-benda lain yang mengandung nutrisi untuk pertumbuhan jamur. Terdapat 1,5 juta spesies jamur dan <5% yang telah diidentifikasi (Mueller, Bills, dan Foster, 2004; Mueller dan Schmit, 2007).

Beberapa genus jamur penghasil enzim yang mampu memutus ikatan glikosida antara lain *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Candida*, *Cladosporium*, dan *Tricoderma* (Gambar 2.1). Identifikasi morfologi jamur dapat digunakan sebagai langkah awal untuk menentukan genus jamur. Identifikasi morfologi meliputi morfologi koloni (bentuk, warna, tepian, dan elevasi koloni jamur), dan morfologi sel (bentuk hifa, ada tidaknya pseudohifa, dan alat reproduksi) (Ashlihah dan Alami, 2014; Jumiyati, dkk., 2012).



Gambar 2.1 Bentuk sel jamur genus (a) *Aspergillus*, (b) *Penicillium*, (c) *Paecilomyces* (d) *Candida*, (e) *Cladosporium* (f) *Trichoderma* (Jumiyati, dkk., 2012; Bensch, Braun, Groenewald, dan Crous, 2012; Naveenkumar dan Thippeswamy, 2013; Houbraken, Vries, Samson, 2014).

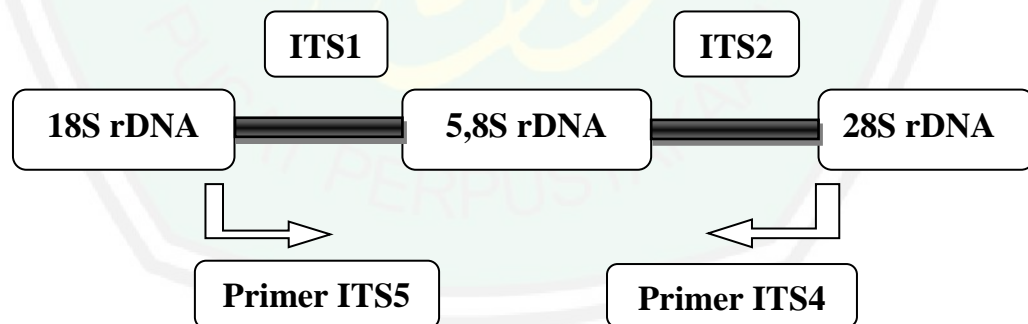
Hasil identifikasi fenotip perlu diklarifikasi dengan identifikasi genotip karena beberapa jamur memiliki morfologi yang sama. Identifikasi genotip pada jamur dapat dilakukan dengan identifikasi sekuen DNA daerah *Internal Transcribe Spacer* (ITS) (Fujita, dkk., 2007; Mulyatni, dkk., 2011; Purnamasari, dkk., 2012). Sekuen daerah ITS merupakan gen penyandi pada jamur.

2.2 Gen Daerah *Internal Transcribe Spacer* (ITS) DNA Ribosomal

Gen penyandi pada jamur berada pada DNA ribosomal (rDNA). DNA ribosomal jamur (eukariotik) memiliki 3 macam daerah *conserve* yang berada pada subunit besar ribosom (5,8S, dan 28S rRNA) dan subunit kecil ribosom (18S

rRNA). DNA ribosom subunit besar dan subunit kecil dipisahkan oleh dua buah sekuen yang disebut *spacer* (Korabecna, 2007; Mulyatni, dkk., 2011; Schoch, dkk., 2012). Gen penyandi *conserve* dipisahkan oleh sekuen daerah ITS (Brien, dkk., 2005; Gomes, dkk., 2002).

Jamur mempunyai dua sekuen gen daerah ITS yakni ITS1 dan ITS2. Gen daerah ITS adalah sekuen gen DNA *non-coding* dimana sekuen daerah ITS1 berada diantara sekuen 18S dan 5,8S rDNA dan daerah ITS2 berada di antara sekuen 5,8S dan 28S rDNA (Brien, dkk., 2005; Gomes, dkk., 2002; Yan-Lin, dkk., 2010). Sekuen daerah ITS1 dan ITS2 banyak diamplifikasi untuk identifikasi molekuler pada jamur. Penelitian Blaadid, dkk (2013) membandingkan sekuen ITS1 dan ITS2 sebagai DNA *barcodes* pada jamur menunjukkan hasil kemiripan yang tinggi 97%. Skema urutan gen daerah ITS1 dan ITS2 pada jamur ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Urutan daerah ITS1 dan ITS2 pada DNA ribosomal (Bellemain dkk., 2010; Fujita, dkk., 2007; Martin dan Rygiewicz, 2005).

Ukuran sekuen ITS1 dan ITS2 masing-masing sekitar 200 pb. Sekuen jamur *Trichoderma viridie* AJ230686 ditunjukkan pada Gambar 2.3. Ukuran sekuen gen daerah ITS1 sebesar 183 pb, sedangkan ukuran sekuen gen daerah

ITS2 sebesar 175 pb. Sekuen gen 5,8S rDNA yang terdapat diantara sekuen ITS1 dan ITS2 juga ikut teranalisis. Ukuran sekuen gen 5,8S sebesar 157 pb. Pasangan primer yang umum digunakan adalah pasangan primer ITS5-ITS4 dan ITS1-ITS4 (Fujita, dkk., 2007; Rahayu, dkk., 2015; Korabecna, 2007; Rambe, dkk., 2014; Izumitsu, dkk., 2012). Sekuen pasangan Primer ITS1-ITS4 dan ITS5-ITS4 ditunjukkan pada Tabel 2.1.

```
>Trichoderma viridie AJ230686
TAGAAGTCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGA
GTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACCATAACCAACTGTTGCCTCGGCGGG
GGTCACGCCCCGGGTGTGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCGCGGAGGGAC
CAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCTCGCGGACGTTATTTCTTACAGCTCTGA
GCAAAAATTCAAAATGAATCAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCA
TGCCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCCTCCGGGGGTCCGGCGTTG
GGGATCGGGAACCCCTAAGACGGGATCCCGGCCCGAAATACAGTGGCGGTCT
CGCCGCAGCCTCTCATGCGCAGTAGTTTGCACAACCTCGCACC GGGAGCGCGGC
-----
```

Gambar 2.3 Sekuen lengkap ITS rRNA *Trichoderma viridie* AJ230686, sebagian 18S rDNA (merah), ITS1 (hijau), 5,8S rDNA (hitam), ITS2 (biru), sebagian 28S rDNA (kuning) (<https://www.ncbi.nlm>).

Tabel 2.1 Sekuen Pasangan Primer ITS1-ITS4 dan ITS5-ITS4.

Pasangan Primer		Sekuen
ITS1-ITS4	ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
	ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
ITS5-ITS4	ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'
	ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Penelitian Korabecna (2007) menggunakan pasangan primer ITS1-ITS4 mendapatkan sekuen dengan ukuran 550-880 pb. Penelitian Purnamasari, dkk., (2012) menggunakan pasangan primer ITS1-ITS4 mendapatkan sekuen dengan ukuran 650 pb. Penelitian Rahayu, dkk (2015) menggunakan pasangan primer

ITS-5-ITS4 mendapatkan sekuen dengan ukuran 537 pb. Penelitian Mulyatni, dkk (2011) menggunakan pasangan primer ITS5-ITS4 mendapat sekuen dengan ukuran 600-700 pb.

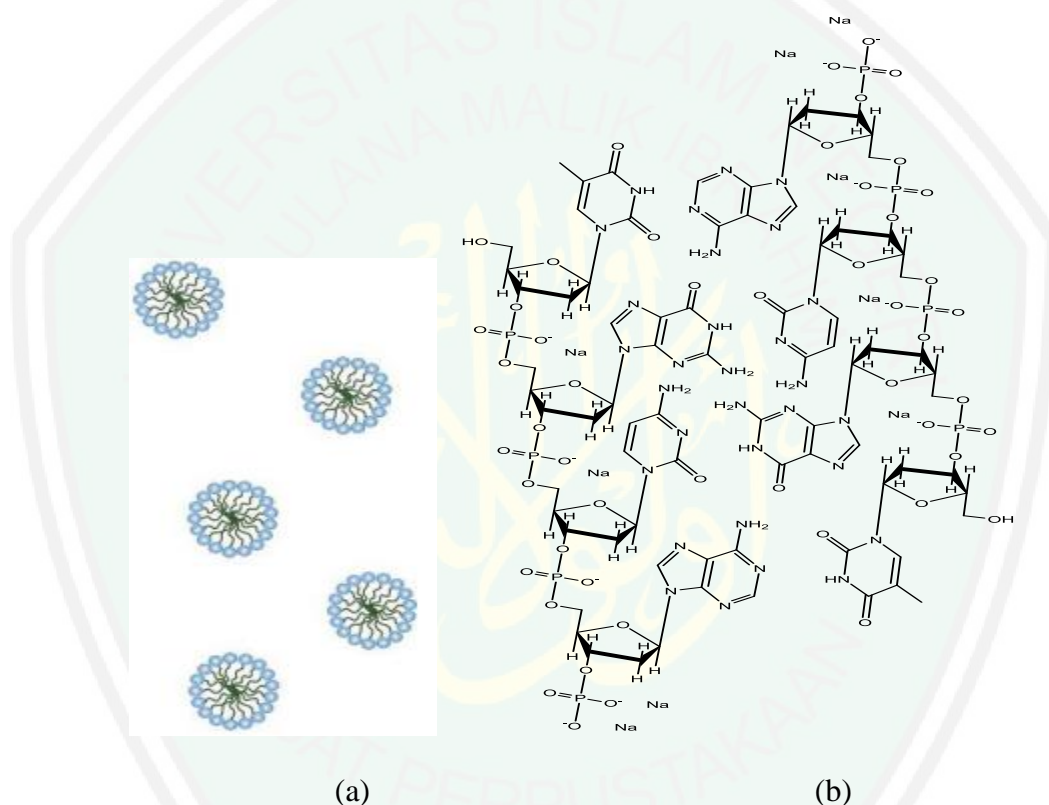
2.3 Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl

Isolasi DNA adalah proses pemisahan DNA dari komponen lain untuk mendapatkan DNA murni. Isolasi DNA dilakukan dengan metode CTAB/NaCl karena lebih murah dan DNA hasil isolasi memiliki kemurnian yang tinggi (Jamsari, 2008; Mishra, Tripathi, dan Tiwari, 2014). Kualitas DNA hasil isolasi sangat berpengaruh untuk tahapan selanjutnya. Metode CTAB/NaCl memberikan hasil yang baik karena terjadi beberapa kali pemurnian DNA. Isolasi DNA secara umum melalui 3 tahapan, yaitu lisis sel, ekstraksi DNA, dan pemurnian DNA (Surzycki, 2000).

Proses lisis sel dengan penambahan surfaktan SDS 10% dan CTAB. Surfaktan akan melemahkan dinding sel yang tersusun dari peptidoglikan dan lemak sehingga menyebabkan lisis sel. Larutan bufer TE ditambahkan untuk menjaga pH dan mengkelat logam *co-factor* enzim DNase yang dapat mendegradasi DNA. Penambahan NaCl 5M dan inkubasi pada suhu 65°C akan memecah sel karena perbedaan konsentrasi di dalam dan di luar sel. DNA, RNA, dan komponen sel lain akan keluar dari sel. (Surzycki, 2000).

Proses ekstraksi memisahkan DNA dari komponen lain (RNA, protein, lemak, dan bagian-bagian sel) dengan CTAB/NaCl. NaCl konsentrasi tinggi untuk mencegah CTAB berinteraksi dengan DNA karena muatan negatif dari DNA berinteraksi dengan Na⁺ (Gambar 2.4 b). CTAB berinteraksi dengan protein dan

lemak membentuk misel (Gambar 2.4 a). Komponen selain DNA yang bersifat hidrofobik diekstrak dengan penambahan klorofom dan fenol. Fenol menyebabkan protein terdenaturasi dan terpresipitasi pada *interphase*. Komponen hidrofobik selain DNA akan larut dalam klorofom dan dapat dipisahkan dari DNA.



Gambar 2.4 (a) Interaksi CTAB dengan lemak dan protein membentuk misel (Chin, 2015). (b) Interaksi antara muatan negatif DNA dengan NaCl.

DNA dalam fasa air dipresipitasi dengan penambahan isopropanol dan etanol 70%. Senyawa alkohol akan berinteraksi dengan air dan menurunkan kelarutan DNA dalam air. Etanol 70% dapat menghilangkan residu CTAB karena bersifat semipolar dan mempercepat pengeringan pelet DNA. DNA diresuspensi

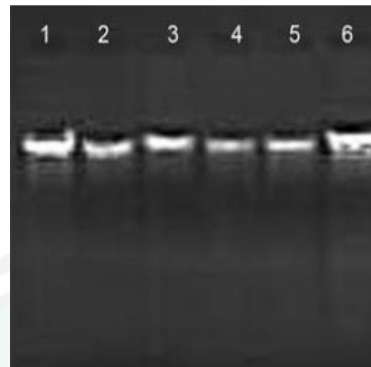
dengan bufer TE dan disimpan pada suhu -72°C untuk mencegah terjadinya denaturasi pada DNA (Surzycki, 2000).

2.4 Elektroforesis Gel Agarose

Elektroforesis gel agarose adalah metode analisis semi kuantitatif untuk mengetahui hasil isolasi DNA. Prinsip dari elektroforesis gel agarose adalah memisahkan molekul-molekul DNA berdasarkan ukurannya melalui pori-pori pada gel agarose dengan bantuan arus listrik. Molekul dengan ukuran kecil akan terpisah dengan cepat dari pada molekul dengan ukuran lebih besar (Novel, dkk., 2010).

Proses elektroforesis menggunakan sebuah marker sebagai penanda ukuran DNA. Hasil elektroforesis berupa pita DNA yang teramati dibawah sinar UV (Rambe, dkk., 2014). Pita yang tebal dan tidak *smear* menunjukkan hasil isolasi DNA yang baik (Jamsari, 2008; Mishra, Tripathi, dan Tiwari (2014). Gambar pita DNA dengan metode CTAB/NaCl ditunjukkan pada Gambar 2.5.

Gambar 2.5 menunjukkan hasil elektroforesis sampel DNA 6 jamur jenis *Aspergillus*. DNA hasil isolasi memiliki kualitas yang baik ditunjukkan dengan pita yang tebal. Kemurnian dan konsentrasi DNA ditentukan dengan Spektrofotometer NanoDrop ND-1000. Rasio kemurnian DNA murni adalah 1,8-2,0 (Surzycki, 2000).



Gambar 2.5 Hasil elektroforesis gel agarosa DNA metode CTAB/NaCl (Mishra, Tripathi, dan Tiwari, 2014).

2.5 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

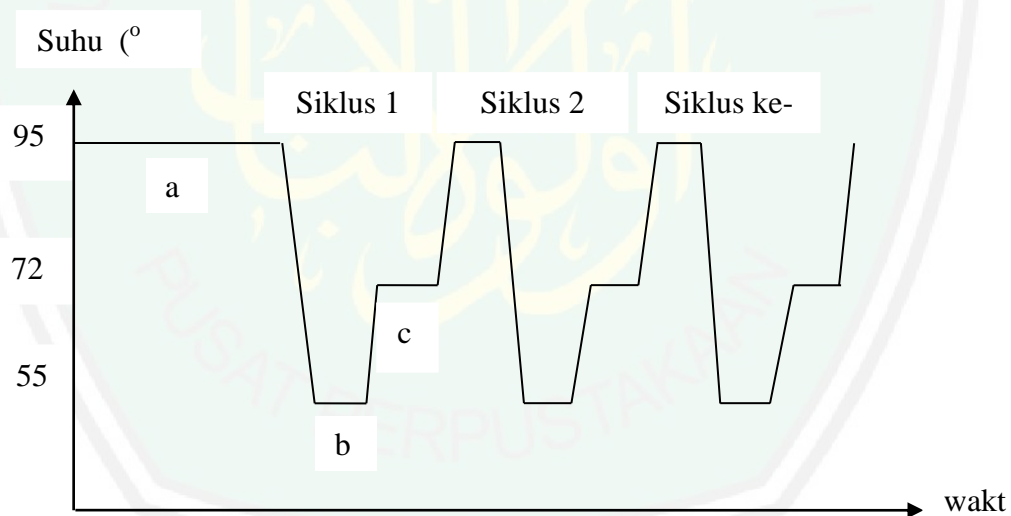
PCR adalah metode amplifikasi sekuen DNA secara enzimatik. Proses amplifikasi berjalan dengan cepat dan akurat karena menggunakan enzim spesifik dalam reaksi (Joko, dkk., 2011). Enzim yang berperan dalam proses amplifikasi adalah enzim DNA polymerase yang mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA menjadi ribuan sampai jutaan kali dalam waktu singkat (Zuhriana, 2010).

Prinsip umum reaksi amplifikasi PCR adalah reaksi sintesis rantai tunggal DNA oleh pasangan primer dengan penyesuaian suhu reaksi. Reaksi PCR melibatkan 5 komponen utama yaitu DNA template, sepasang primer, enzim DNA Taq polymerase, deoksinukleotida triphosphates (dNTPs), dan buffer PCR (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Tahapan PCR adalah denaturasi, penempelan primer (*annealing*), dan pemanjangan primer (*extension*).

Tahap pertama adalah denaturasi untai ganda DNA menjadi rantai tunggal pada suhu 92-97,5°C selama 1-2 menit. Suhu yang dipakai merupakan rentang suhu aktifitas dari enzim DNA Taq polimerase. DNA harus didenaturasi sehingga primer dapat menempel pada DNA cetakan.

Tahap kedua adalah *annealing* pada suhu 50-60°C selama 1 menit. Primer akan menempel pada DNA cetakan yang urutan basanya komplemen. Fungsi primer untuk membatasi target amplifikasi. Primer menjadi sangat penting karena pemilihan primer yang tepat akan mengamplifikasi sekuen DNA target.

Tahap ketiga adalah *extention* pada suhu 72°C selama 1 menit. Nukleotida dari dNTPs yang komplemen menempel pada DNA cetakan dan terjadi reaksi polimerisasi. Ketiga tahap ini disebut satu siklus reaksi amplifikasi. Reaksi amplifikasi berjalan sebanyak 25-30 siklus. Amplifikasi lebih dari 30 siklus memberikan hasil yang kurang signifikan. Skema proses PCR diilustrasikan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Skema reaksi PCR (a) Denaturasi DNA, (b) Penempelan primer, (c) Pemanjangan primer (Choudhary, dkk., 2011; Zuhriana, 2010).

2.6 DNA menurut Al-Quran

DNA merupakan suatu kode genetik yang diturunkan dari satu generasi ke generasi selanjutnya. DNA sebagai pembawa sifat suatu makhluk yang identik dengan orang tuanya baik dari sifat, warna, bentuk, dan ciri-ciri lainnya. DNA

juga dapat digunakan untuk mengetahui kekerabatan suatu makhluk hidup dengan makhluk hidup lain. Allah SWT berfirman dalam QS Al-Furqon ayat 54.

وَهُوَ الَّذِي خَلَقَ مِنَ الْمَاءِ بَشَرًا فَجَعَلَهُ نَسَبًا وَصِهْرًا ۗ وَكَانَ رَبُّكَ قَدِيرًا

Artinya : *Dan Dia (pula) yang menciptakan manusia dari air lalu dia jadikan manusia itu (punya) keturunan dan mushaharah dan adalah Tuhanmu Maha Kuasa (QS Al-Furqon : 54).*

Makna dari QS Al-Furqon ayat 54 adalah suatu makhluk hidup memiliki nasab yang berkaitan dengan orang tuanya. Berdasarkan penjelasan tersebut maka benar jika urutan DNA antar generasi memiliki kemiripan. Penjelasan surah Al-Furqon ayat 54 ini sesuai dengan teori ; menyebutkan bahwa DNA merupakan sebuah kode genetik yang diturunkan ke generasi berikutnya. Urutan DNA akan berulang pada keturunannya. Penurunan atau pengulangan suatu urutan DNA pada satu generasi ke generasi selanjutnya merupakan kehendak Allah SWT. Allah SWT berfirman dalam QS Al-Ankabut ayat 20.

قُلْ سِيرُوا فِي الْأَرْضِ فَانظُرُوا كَيْفَ بَدَأَ الْخَلْقَ ۗ ثُمَّ اللَّهُ يُنشِئُ النَّشْأَةَ الْآخِرَةَ ۗ إِنَّ اللَّهَ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ قَدِيرٌ

Artinya : *Katakanlah: "Berjalanlah di (muka) bumi, maka perhatikanlah bagaimana Allah menciptakan (manusia) dari permulaannya, kemudian Allah menjadikannya sekali lagi. Sesungguhnya Allah Maha Kuasa atas segala sesuatu (QS Al-Ankabut : 20).*

Maha Besar Allah tuhan seluruh yang alam mampu menciptakan sesuatu dengan segala fungsi dan manfaat. Semua ciptaan Allah SWT pasti memiliki manfaat, begitu juga dengan DNA yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi kekerabatan suatu makhluk hidup. Manfaat atas segala ciptaan Allah SWT telah dijelaskan dalam QS Ali Imron ayat 191.

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ قِنَا عَذَابَ النَّارِ

Artinya : (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka (QS Ali Imron : 191).





BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi dan Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dimulai sejak bulan Juli sampai Desember 2017.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam identifikasi fenotip adalah seperangkat alat gelas, jarum ose, stirer, *hotplate*, neraca analitik, bunsen, autoklaf (Hirayama), kantong plastik tahan panas ukuran 1 kg, *Laminar Air Flow* (ECOS), dan mikroskop. Proses isolasi DNA jamur menggunakan waterbath, sentrifuse (Thermo Scientific), mikropipet (Bio-Rad), freezer, *microcentrifuge tube*, vortex (Maxi Mix II), *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, seperangkat alat elektroforesis gel agarose (Bio-Rad), UV-transiluminator, spektrofotometer nanodrop (Thermo Scientific). Proses amplifikasi menggunakan instrument *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dan *PCR tube*.

3.2.2 Bahan

Sampel jamur selulolitik diisolasi dari batubara yang diambil dari PLTU Paiton Probolinggo. Identifikasi fenotip menggunakan aquades, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (MERCK), karboksi metil selulase agar (CMC), *congo red* 0,1 %, dan *agarose*.

Iodin 1%, NaCl 1M (MERCK), NaCl 5M, etanol 70% (OneMed), dan etanol 70% (MERCK). Isolasi DNA menggunakan bufer TE (Tris-EDTA) pH 8, CTAB/NaCl, SDS 10%, fenol:kloroform (25:25), Isoapropanol, dan etanol 70% (MERCK). Reaksi amplifikasi DNA menggunakan DNA templat, master mix PCR (Vivantis), primer ITS-5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'), primer ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Macrogen). Elektroforesis gel agarose memerlukan agarose (Vivantis), bufer TAE 1X, larutan ethidium bromide (EtBr), *loading dye*, dan aquabidestilata (ddH₂O).

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini antara lain :

1. Penumbuhan jamur pada batu bara.
2. Isolasi jamur dari batu bara.
3. *Screening* jamur selulolitik dan amilolitik.
4. Pengamatan morfologi jamur.
5. Isolasi DNA jamur metode CTAB/NaCl.
6. Elektroforesis gel agarosa dan Spektrofotometer Nanodrop.
7. Amplifikasi gen daerah ITS.
8. Sekuensing.
9. Analisis bioinformatika.

3.4

Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Media Tumbuh Jamur *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Medium PDA dibuat dengan melarutkan 3,8 gram PDA dalam 100 mL aquades. Larutan PDA dipanaskan sampai mendidih dan diaduk dengan stirrer kemudian diautoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C tekanan 1 atm. PDA dituangkan dalam cawan petri sampai seluruh dasar cawan terendam PDA. Cawan petri ditutup dan dibungkus dengan plastik wrap dan dapat digunakan setelah mengeras.

3.4.2 Isolasi Jamur dari Batu bara

Isolasi jamur dari batu bara dilakukan dengan metode pengenceran. Sepuluh gram batu bara yang ditumbuhi jamur dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL berisi 100 mL aquades. Erlenmeyer dishaker selama 30 menit dengan kecepatan 100 rpm. Satu mililiter bagian yang jernih dipipet ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL aquades. Sampel diencerkan sampai 10^{-3} . Sebanyak 100 μ L hasil pengenceran dituangkan kedalam cawan petri. Media PDA suhu 50°C dituangkan ke dalam cawan petri dan ditutup plastik wrap. Cawan petri diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari.

3.4.3 *Screening* Jamur Selulolitik

Screening jamur selulolitik dilakukan dengan cara inokulasi menggunakan jarum ose pada media PDA-CMC 1%. Setiap koloni jamur digoreskan pada media PDA-CMC 1% yang terpisah. Cawan petri segera ditutup dengan plastik wrap. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3 hari. Diamati zona

bening yang terbentuk di sekitar koloni jamur dengan cara ditetesi dengan larutan *congo red* 0,1% (0,1 mg/mL) selama 15 menit kemudian dicuci dengan larutan NaCl 1M. Jamur selulolitik akan menghasilkan zona bening di sekitar koloninya. Jamur yang memiliki aktifitas selulolitik digunakan dalam analisis selanjutnya.

3.4.4 Screening Jamur Amilolitik

Screening jamur amilolitik dilakukan dengan menginokulasikan jamur pada media PDA-Strach 1% dengan jarum ose. Cawan petri diinkubasi selama 3 hari pada suhu ruang. Media ditetesi dengan larutan iodin 1% untuk mengamati zona bening yang terbentuk akibat terdegradasinya amilum oleh enzim amilase menjadi glukosa.

3.4.5 Pengamatan Morfologi

Pengamatan morfologi dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik dengan pengamatan koloni meliputi pengamatan bentuk, warna, tekstur, tepian, dan elevasi koloni jamur. Pengamatan mikroskopik meliputi pengamatan bentuk sel, bentuk hifa atau miselium, bentuk spora, dan ada tidaknya sekat pada hifa.

3.4.6 Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl

Isolasi DNA jamur dilakukan dengan metode CTAB/NaCl. Miselium jamur sebanyak 250 mg dimasukkan dalam mikrotube 1,5 mL dan ditambahkan 567 μ L buffer TE dan 33 μ L SDS 10% kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 1 jam. Sampel ditambahkan 100 μ L NaCl 5 M dan 80 μ L CTAB-NaCl dan

diinkubasi kembali pada suhu 65°C selama 10 menit. RNase ditambahkan sebanyak 10 µL untuk menghilangkan RNA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit. Fenol sebanyak 800 µL ditambahkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit untuk mempresipitasi protein. Fasa air dipisahkan dan ditambahkan P:C (50:50) sebanyak 1:1 dengan sampel dan disentrifugasi kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Fasa air dipisahkan dari fasa organik dan ditambahkan isopropanol dingin sebanyak 0,6x volume sampel dan 50 µL etanol 70% dingin dan disentrifugasi kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Endapan DNA diresuspensi dengan 50 µL bufer TE dan disimpan pada suhu -72°C. DNA hasil isolasi divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose dan spektrofotometer Nanodrop untuk mengetahui kemurniannya.

3.4.7 Elektroforesis Gel Agarose

DNA hasil isolasi di elektroforesis gel agarose 1%. Gel agarose dibuat dengan melarutkan 0,4 gram agarosa dalam 40 ml bufer TAE). Agarosa kemudian dipanaskan dalam microwave selama 3 menit dan dituangkan ke dalam cetakan gel dan ditunggu sampai mengeras. Gel agarose dimasukkan dalam alat elektroforesis. Bak elektroforesis diisi dengan larutan bufer TAE 1x pada sampai terendam. Sampel DNA dimasukkan 3 µL dan 1 µL loading dye ke dalam sumuran. Alat elektroforesis dijalankan pada tegangan 65 Volt selama 50 menit. Gel dikeluarkan dari bak dan divisualisasikan pada UV-transiluminator untuk mengetahui pita yang terbentuk.

Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi ditentukan dengan Nanodrop spektrofotometer (ND-1000). Sebanyak 1 µL diteteskan pada alat

deteksi dan diatur absorbansi pada 260 nm dan 280 nm. DNA dikatakan bebas dari pengotor jika kemurniannya berada pada rentang nilai 1,8 – 2,0.

3.4.8 Amplifikasi Gen Daerah ITS

Reaksi amplifikasi dilakukan dengan alat PCR dengan pasangan primer ITS5 sebagai primer maju dan ITS4 sebagai primer mundur. Volume total dalam reaksi PCR adalah 27,1 μ L dengan komposisi 1,2 μ L DNA templat, masing-masing 1,2 μ L primer ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') dan ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), dan 23,5 μ L master mix PCR.

Amplifikasi dimulai dengan tahap denaturasi DNA templat selama 30 detik pada suhu 95°C. Tahap kedua penempelan primer pada DNA templat yang telah terdenaturasi selama 30 detik pada suhu 55°C. Tahap ketiga pemanjangan sekuen DNA selama 30 detik pada suhu 72°C. Ketiga tahap ini terjadi sebanyak 30 siklus. Hasil amplifikasi selanjutnya dielektroforesis gel agarose 1% untuk mengetahui hasil amplifikasi dengan terbentuknya pita tebal pada 500-800 pb.

3.4.9 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA dilakukan dengan *sequencer machine* di First BASE Laboratory The Gemini Singapore Park melalui PT Genetic Science Indonesia di Jakarta. Data hasil sekuensing berupa file ABI dan dianalisis bioinformatika dengan beberapa aplikasi.

3.4.10 Analisis Bioinformatika

Analisis bioinformatika sekuen DNA hasil sekuensing menggunakan beberapa aplikasi seperti Blast-N, MEGA6, dan DNA *Baser*. DNA *Baser* digunakan untuk mengambil daerah basa dengan intensitas tinggi (contig). Analisis kemiripan sekuen DNA dilakukan dengan *Basic Local Alligment Seacrh Tool for nukleotida* (BLAST-n) (Mulyatni dkk., 2011). Aplikasi MEGA6 digunakan untuk mengetahui kedekatannya dengan jamur lain (Choudhary, dkk., 2011).







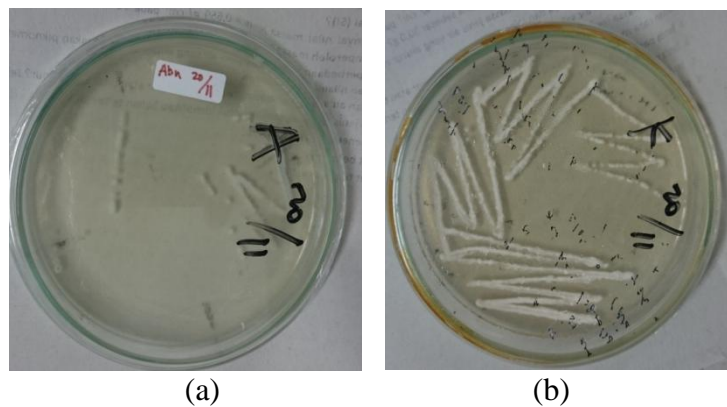
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jamur merupakan satu kingdom tersendiri dalam klasifikasi makhluk hidup. Spesies jamur di alam diperkirakan berjumlah lebih dari 1,5 juta dan masih sekitar 5% yang telah diidentifikasi (Mueller dan Schmit, 2007). Pitarini (2014) mengisolasi jamur dari batubara. Jamur hasil isolasi belum diketahui jenisnya sehingga perlu diidentifikasi secara fenotip dan genotip. Fokus utama penelitian ini pada identifikasi secara genotip.

4.1 Isolasi Jamur

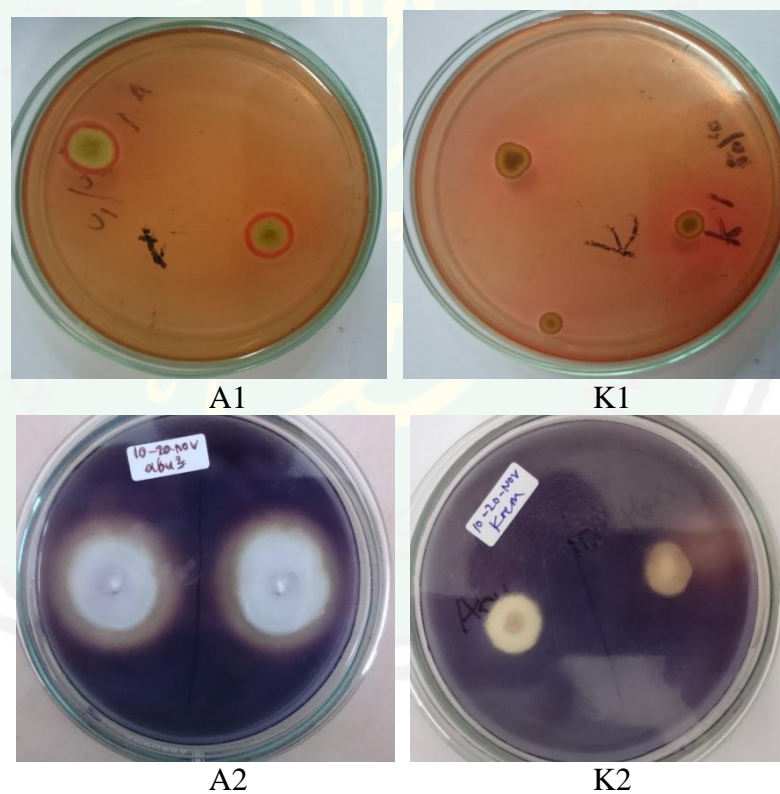
Isolasi jamur dilakukan dengan pengenceran sebanyak 10^{-3} untuk mendapatkan koloni tunggal jamur. Jamur diinokulasi pada media PDA sebagai sumber nutrisi pertumbuhan jamur dengan metode *spread plate*. Hasil isolasi tumbuh 2 koloni jamur dengan warna putih keabu-abuan (isolat A BTBR) dan krem (isolat K BTBR). Gambar isolat jamur dari batubara ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Isolat jamur dari batubara (a) isolat A BTBR, dan (b) isolat K BTBR.

4.2 Uji Aktifitas Enzim

Kedua isolat diuji aktifitas enzim selulase dan amilasena dalam indeks selulolitik dan amilolitik. Indeks selulolitik dan amilolitik adalah nisbah atau perbandingan diameter zona bening yang terbentuk dengan diameter koloni (Meryandini, dkk., 2009; Nurfitriyani dan Handayanto, 2017). Isolat A BTBR dan isolat K BTBR diuji aktifitas enzim selulolitik pada media PDA+CMC 1% dan aktifitas enzim amilase pada media PDA+starch 1% (Gambar 4.2).



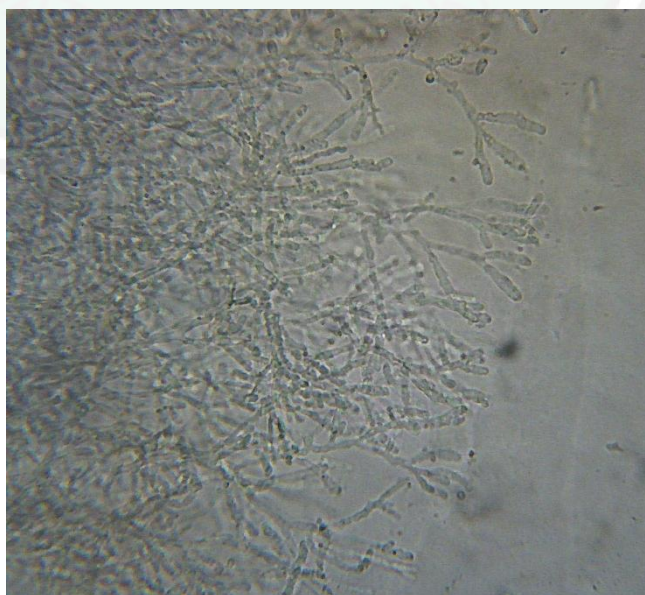
Gambar 4.2 Uji aktifitas enzim selulase (A1 dan K1) dan enzim amilase (A2 dan K2) pada isolat A BTBR (A1 dan A2), dan isolat K BTBR (K1 dan K2).

Isolat A BTBR dan isolat K BTBR memiliki nilai indeks selulolitik yang sama sebesar 1,14. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua isolat memiliki aktifitas

enzim selulase yang sama besarnya ditunjukkan dari ukuran zona bening yang sama. Hasil untuk indeks amilolitik isolat A BTBR sebesar 1,33 dan isolat K BTBR sebesar 1,0. Hasil uji aktifitas enzim amilase menunjukkan bahwa aktifitas enzim isolat A BTBR lebih besar dari isolat K BTBR terlihat dari zona bening yang terbentuk pada isolat A BTBR yang besar dan tidak terlihat zona bening pada isolat K BTBR. Isolat A BTBR diidentifikasi lebih lanjut karena memiliki aktifitas enzim yang baik.

4.3 Pengamatan Morfologi Jamur

Pengamatan morfologi jamur meliputi pengamatan terhadap bentuk koloni, warna koloni dan pengamatan dengan mikroskop. Isolat A merupakan jamur dengan bentuk koloni bulat, tepian rata, dan permukaan bergelombang. Bagian atas koloni jamur berwarna putih dan bagian bawah koloni berwarna putih keabu-abuan. Hasil pengamatan mikroskopik isolat A ditunjukkan pada Gambar 4.3.

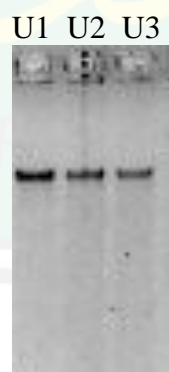


Gambar 4.3 Pengamatan morfologi isolat A BTBR dengan perbesaran 40x.

Hasil pengamatan mikroskopik isolat A BTBR menunjukkan bentuk hifa dengan ujung bercabang. Hifa jamur bersekat-sekat dengan ujung hifa lebih besar dari bagian hifa karena terdapat spora. Berdasarkan Gambar 4.3, jamur isolat A BTBR mirip dengan jamur genus *Penicillium* pada Gambar 2.1 b (Houbraken, Vries, dan Samson, 2014).

4.4 Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl

Isolasi DNA dilakukan dengan 3 kali pengulangan (U1, U2, dan U3). DNA hasil isolasi dengan kemurnian yang baik akan menghasilkan pita DNA yang tebal dan tunggal pada bagian atas gel karena ukuran DNA genom yang besar. Hasil analisis dengan elektroforesis gel agarosa ditunjukkan pada Gambar 4.4. Ketiga sampel hasil isolasi DNA kemurnian yang baik ditunjukkan dengan pita tebal, tunggal, dan tidak ada smear pada ketiga lajur hasil elektroforesis.



Gambar 4.4 Hasil elektroforesis gel agarose sampel isolasi DNA isolat A BTBR metode CTAB/NaCl (U1, U2, U2 adalah ulangan 1, ulangan 2, dan ulangan 3).

Analisis secara kuantitatif dengan Spektrofotometer Nanodrop dilakukan untuk membandingkan hasil analisis secara kualitatif dengan elektroforesis gel

agarosa. Kemurnian DNA ketiga sampel berturut-turut adalah 2,05; 2,02; dan 1,97 dengan nilai kemurnian rata-rata 2,01. Konsentrasi ketiga sampel hasil isolasi DNA berturut turut adalah 287,39 ng/ μ L, 270,77 ng/ μ L, 269,53 ng/ μ L dengan nilai konsentrasi rata-rata 275,89 ng/ μ L. Ratio A260/A280 untuk kemurnian DNA adalah 1,8-2,0 (Surzycki, 2000).

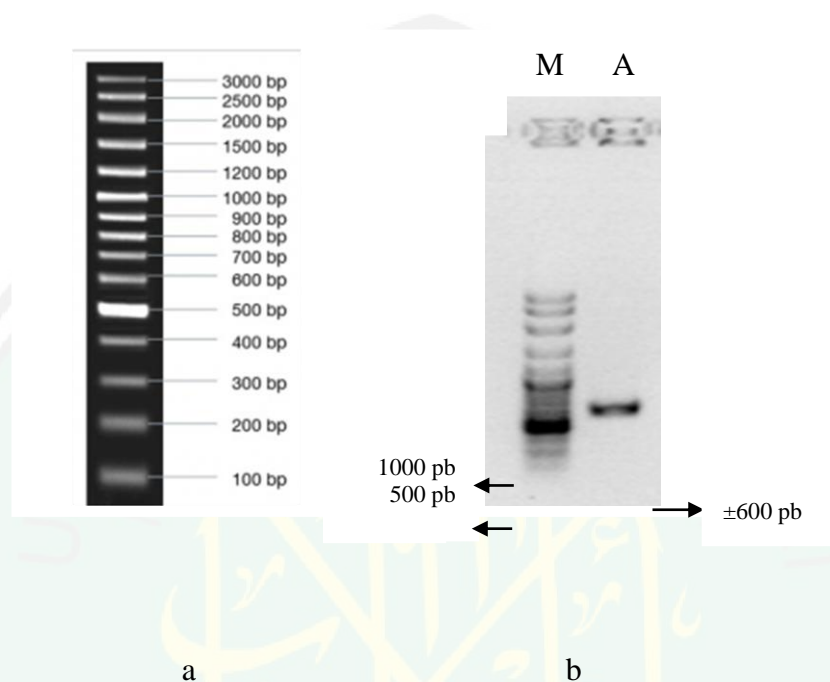
4.5 Amplifikasi Sekuen Daerah ITS

Amplifikasi sekuen daerah ITS menggunakan pasangan primer ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') sebagai *foward primer* dan ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') sebagai *reverse primer*. Proses *annealing* berjalan pada suhu 55°C selama 30 detik. Proses amplifikasi sangat bergantung pada suhu *annealing* yang sesuai (Handoyo dan Rudiretna, 2001). Suhu optimum *annealing* untuk pasangan primer ITS5-ITS4 berdasarkan literatur adalah 55°C (Ristaino, dkk., 1998; Yan-Lin, dkk., 2010).

Sampel hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa untuk mengetahui keberhasilan proses amplifikasi sekuen daerah ITS. Hasil analisis elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa sekuen daerah ITS jamur berhasil diamplifikasi dengan pasangan primer ITS5-ITS4. Hasil visualisasi gel agarosa ditunjukkan pada Gambar 4.5.

Pita elektroforesis dari sampel dibandingkan dengan pita marker VC 100bp Vivantis untuk mengetahui panjang sekuen yang dihasilkan. Hasil amplifikasi sekuen daerah ITS dengan pasangan primer ITS5-ITS4 pada jamur berukuran \pm 650 pb. Konsentrasi produk hasil amplifikasi sebesar 159,28 ng/ μ L.

Ukuran sekuen daerah ITS berdasarkan literatur adalah 500-800 pb (Korabecna, 2007; Purnamasari, dkk., 2012; Schoch, dkk., 2012).



Gambar 4.5 (a) Marker Vivantis VC 100 bp, (b) Visualisasi gel agarosa. M : marker VC 100 bp, A : produk amplifikasi sekuen ITS isolat A BTBR.

4.6 Analisis Bioinformatika

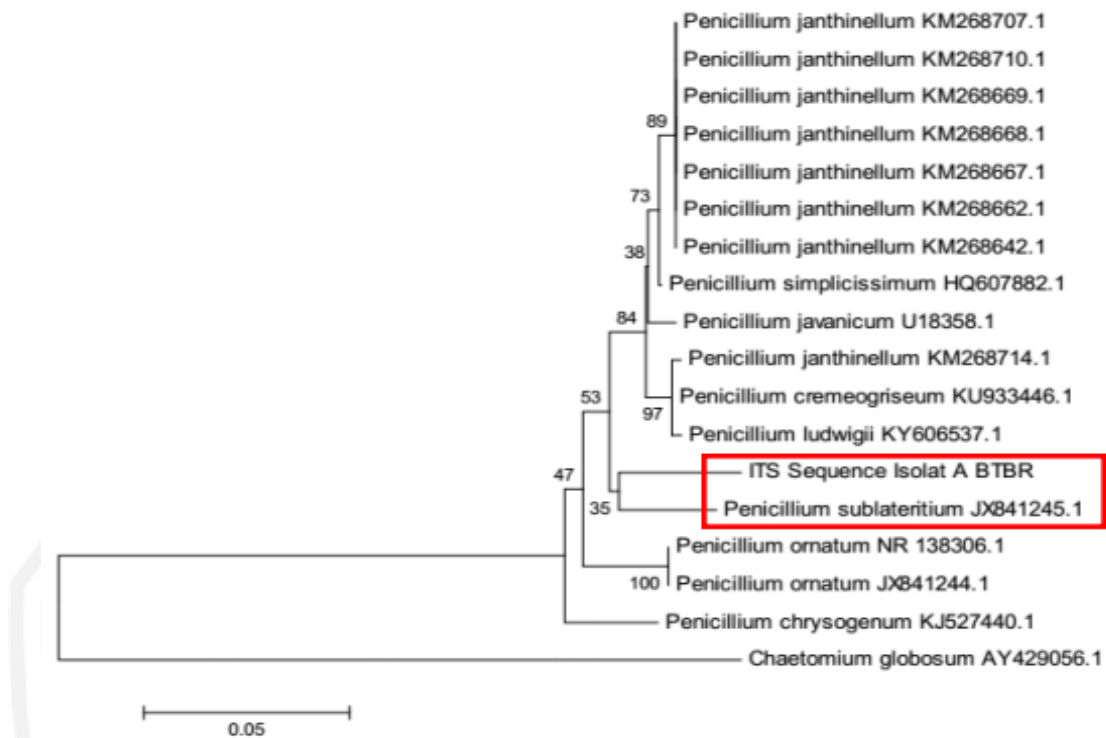
Data hasil sekuensing berupa sekuen pada *foward primer* dan *reverse primer* yang terpisah. Kedua sekuen digabungkan menggunakan software DNA Baser. Sekuen yang telah digabungkan (*dicontig*) ditunjukkan pada Gambar 4.6. Sekuen yang telah digabungkan dianalisis dengan BLASTn secara *on-line* pada *genbank* NCBI.

```
TCGTAACAAG GTTTCCGTAG GTGAACCTGC GGAAGGATCA TTACCGAGTG CGGGCCCCTC
TGGGGTCCAA CCTCCCACCC GTGTCTATCG TACCTTGTTG CTCGGCGGG CCCGCCGTCC
CGGCCGCCGG GGGGCCACAC GCCCCGGGC CCGTGCCCGC CGAAGCCCC ATCCTGAACG
CTGTGTGAAG GGTGCAGTCT GAGTGATTAG CTAAATCGGT TAAAACTTTC AACCAACGGAT
CTCTTGGTTC CGGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG TGAATTGCAG
AATTCAGTGA ATCATCGAGT CTTTGAACGC ACATTGCGCC CCCTGGTATT CCGGGGGGCA
TGCCTGTCCG AGCGTCATTG CTGCCCTCA AGCCCGGCTT GTGTGTTGGG CCGTCGTCCC
CTGGCCTCCC GGGGGACGGG CCCGAAAGGC AGCGGCGGCG CCGCGTCCGG TCCTCGAGCG
TATGGGGCTT CGTCACCCGC TCCGTAGGCC CGGCCGGGCG CCGCCGACGA CCAACCCCTT
CTTCAGGTTG ACCTCGGATC AGGTAGGGAT ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TC
```

Gambar 4.6 Sekuen ITS isolat A BTBR jamur dari batu bara.

Sekuen hasil *contig* memiliki panjang 592 pb. Sekuen ITS hasil sekuensing dianalisis BLASTn secara *on-line* dengan *genebank* NCBI. Sekuen dengan persentase kemiripan tertinggi terhadap sekuen ITS Isolat A BTBR hasil sekuensing dipilih untuk dianalisis lebih lanjut. Persentase minimum kemiripan sekuen ITS untuk dapat digolongkan dalam satu spesies adalah 97% (Xu, 2016).

Sekuen-sekuen DNA hasil analisis BLASTn dengan nilai *identity* yang tinggi diambil untuk analisis lebih lanjut. Sekuen ITS isolat A BTBR memiliki *identity* tertinggi sebesar 94% dengan beberapa spesies dari genus *Penicillium*. Sekuen daerah ITS isolat A BTBR dianalisis dengan sekuen lain hasil BLASTn untuk mengetahui kekerabatan antar jamur menggunakan analisis filogenetik. Pohon filogenetik dibangun dengan sekuen jamur-jamur lain pada *genebank* NCBI. Hasil konstruksi pohon filogenetik ditunjukkan pada Gambar 4.7.



Gambar 4.7 Hasil analisis filogenetik sekuen ITS isolat A BTBR dari batu bara.

Hasil analisis pohon filogenetik menunjukkan jarak evolusi genetik yang berdekatan antara Isolat A BTBR dengan jamur genus *Penicillium sublateritium* JX841245.1. Kedekatan antar kedua spesies ini ditunjukkan dengan posisi Isolat A BTBR yang berada pada satu cabang dengan *Penicillium sublateritium* JX841245.1. Kemiripan Isolat A BTBR dengan spesies *Penicillium sublateritium* JX841245.1 sebesar 94,66%.

Nilai *identity* terbesar antara isolat A BTBR dengan sekuen lain adalah dengan *Penicillium simplicissimum* HQ607882.1 sebesar 95,61% dan dengan spesies *Penicillium janthinellum* sebesar 95,12%. *Identity* yang besar tersebut tidak membuat isolat A BTBR berkerabat dekat dengan *Penicillium simplicissimum* HQ607882.1 dan *Penicillium janthinellum* karena *alignment* menghasilkan *gap* yang cukup lebar. *Gap* ini menyebabkan hasil kekerabatan

isolat A BTBR lebih dekat dengan *Penicillium sublateritium* JX841245.1 (Lampiran 7).

Kemiripan sekuen Isolat A BTBR dengan genus *Penicillium sublateritium* JX841245.1 tidak sampai 100% karena ada beberapa bagian sekuen yang mengalami insersi, delesi, dan mutasi (Lampiran 7) (Kurtzman dan Piskur, 2005). Tulsian, Sinha, dan Kumar (2017) mengisolasi dan mengidentifikasi jamur dari batu bara memperoleh 8 genus jamur dan salah satunya adalah spesies *Penicillium chrysogenum*. *Out group* (spesies berbeda) ditambahkan pada analisis filogenetik sebagai pembanding. *Out group* akan menunjukkan kekerabatan yang jauh dengan isolat A BTBR. *Identity* sekuen isolat A BTBR dengan *out group Chaetomium globosum* AY429056.1 sebesar 66,93% (Lampiran 5).

4.7 Kajian DNA dalam Prespektif Al-Quran

Kebenaran Al-Quran sebagai kalam Allah SWT adalah sesuatu yang mutlak untuk dipercaya. Al-Quran memuat banyak sekali kisah-kisah umat terdahulu dan informasi tentang ilmu pengetahuan dan kebesaran Allah SWT dalam setiap penciptaannya. Allah SWT berfirman dalam Quran surah Al-Fusshilat ayat 53 sebagai berikut.

سُنُرِيهِمْ آيَاتِنَا فِي الْأَفَاقِ وَفِي أَنْفُسِهِمْ حَتَّىٰ يَتَبَيَّنَ لَهُمْ أَنَّهُ الْحَقُّ ۗ أَوَلَمْ يَكْفِ بِرَبِّكَ أَنَّهُ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ شَهِيدٌ

Artinya : Kami akan memperlihatkan kepada mereka tanda-tanda (kekuasaan) Kami di segala wilayah bumi dan pada diri mereka sendiri, hingga jelas bagi mereka bahwa Al Quran itu adalah benar. Tiadakah cukup bahwa sesungguhnya Tuhanmu menjadi saksi atas segala sesuatu? (QS Al-Fusshilat : 53).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa kekuasaan Allah SWT itu ada diseluruh alam. Jamur merupakan salah satu makhluk hidup dengan keanekaragaman yang sangat banyak. Mueller dan Schmit (2007) memperkirakan sekitar 1,5 juta lebih jenis jamur yang ada di bumi dengan bentuk dan warna yang berbeda-beda. Kekuasaan Allah SWT dalam penciptaan makhluk yang beranekaragam telah disebutkan dalam QS Al-An'am ayat 99.

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرِجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنْ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ ۗ انظُرُوا إِلَىٰ ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ

Artinya : *Dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (Kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman.*

Keanekaragaman jenis jamur dipengaruhi oleh perbedaan urutan DNA dalam tubuh jamur itu sendiri. DNA yang terdapat dalam tubuh setiap makhluk merupakan tanda kekuasaan Allah SWT yang terdapat dalam diri mereka sendiri sebagaimana disebutkan dalam QS Al-Fussilat ayat 53. Hasan dalam tafsir Al-Qurtubi menjelaskan bahwa Allah SWT dalam menciptakan segala sesuatu telah menentukan ukuran dan kadarnya masing-masing. Pernyataan ini disebutkan dalam firman Allah SWT pada QS Al-Qamar ayat 49.

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ

Artinya : *sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu menurut ukurannya* (QS Al-Qamar : 49)

Ukuran dan urutan DNA telah ditentukan dengan sangat teratur oleh Allah SWT karena perbedaan urutan DNA akan mempengaruhi perbedaan bentuk, rupa, dan fungsinya. Urutan DNA sangat unik, karenanya perbedaan urutan DNA dalam setiap jamur dapat dipergunakan untuk mengidentifikasi dan menentukan jenis suatu jamur. Berdasarkan ayat-ayat yang telah disebutkan dapat disimpulkan bahwa ada sesuatu dalam tubuh makhluk hidup itu sendiri (DNA) yang berfungsi sebagai sesuatu yang membedakan (jenis, bentuk, warna, rupa) suatu makhluk dengan makhluk yang lain. Urutan DNA yang unik dengan banyak sekali manfaatnya merupakan salah satu bukti kekuasaan Allah SWT dan menunjuk keluasan ilmu Allah SWT atas seluruh alam semesta ini.



BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah isolasi jamur dari batu bara mendapatkan isolat A BTBR yang memiliki kemiripan morfologi dengan genus *Penicillium*. Produk amplifikasi sekuen daerah ITS isolat A BTBR berukuran 592 pb. Isolat A BTBR memiliki kekerabatan terdekat dengan spesies *Penicillium sublateritium* dengan kemiripan 94,66%.

5.2 Saran

1. Analisis fenotip lebih lanjut (kecepatan tumbuh, fermentasi gula, uji katalase, hidrolisis protein, dll) perlu dilakukan untuk mengetahui lebih banyak informasi terkait jamur Isolat A BTBR.
2. Identifikasi molekuler terhadap sekuen daerah ITS jamur Isolat A BTBR perlu dilakukan amplifikasi dengan pasangan primer lain untuk membandingkan hasil amplifikasi dengan pasangan primer ITS5-ITS4.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashlihah, N. I., dan Alami, N. H. 2014. Karakterisasi Khamir dari Pulau Poteran. *Jurnal Sains Dan Seni Pomits*, 3(2), 49–52.
- Aydogdu, H., Balkan, B., Balkan, S., Ertan, F. 2012. Amyolytic Activities Of Fungi Species On The Screening Medium Adjusted To Different pH. Hal 1-12.
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., dan Kauserud, H. 2010. ITS as An Environmental DNA Barcode for Fungi : An in Silico Approach Reveals Potential PCR Biases. *BMC Microbiology*. 10(189) : 1–9. <https://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/189>.
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z., dan Crous, P.W. 2012. The Genus *Cladosorium*. 72: 1-401.
- Blaalid, R., Kumar, S., Nilsson, S. H., Abarenkov, K., Kirks, P. M., dan Kauserud, H. 2013. ITS1 Versus ITS2 as DNA Metabarcodes for Fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 218–224. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12065>.
- Brien, H. E. O., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J. M., dan Vilgalys, R. 2005. Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples Fungal Community Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9),5544. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5544-5550.2005>.
- Chin, M. 2015. *Protein Structure Dynamics and Function at Micelle and Particle Interfaces*. Columbia: Columbia University.
- Choudhary, R. K., Ali, M A., dan Lee, J. 2011. Studies on Genetic Diversity Among Populations of *Persicaria barbata* (L .) H . Hara from India Based on Internal Transcribed Spacer Sequences of Nuclear Ribosomal DNA. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(2), 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2010.12.010>.
- Deviani, Sarlly., Haryani, Y., dan Jose, C. 2014. Isolasi dan Uji Aktivitas Bakteri Selulolitik dari Air Muara Daerah Aliran Sungai Siak Wilayah Kabupaten Bengkalis. *JOM FMIPA*. 1(2), 78-88.
- Fatchiyah. 2011. *Biologi Molekuler*. Jakarta : Erlangga.
- Fitrianti, R., Harianie, L., Ahmad, M. 2014. Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Selulase dari Kultur Campuran *Trichoderma sp*, *Gliocladium sp*, dan *Botrytis sp*. yang ditumbuhkan pada Media Kulit Pisang. *Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang*.
- Fujita, S.I., Senda, Y., Nakaguchi, S., dan Hashimoto, T. 2007. The Variability in The Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): ITS Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Journal Of Clinical Microbiology*, 39(10), 3617–3622. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001>.
- Gomes, E. A., Kasuya, M. C. M., Barros, E. G., Borges, A. C., dan Araujo, E. F. 2002. Polymorphism in The Internal Transcribed Spacer (ITS) of The

- Ribosomal DNA of 26 Isolates of *Ectomycorrhizal* Fungi, 483, 477–483. [http:// www.sbg.org.br](http://www.sbg.org.br).
- Handoyo, D., dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). 9(1), 17–29.
- Hanum, A. M., dan Kuswyasari, N. D. 2014. Laju Dekomposisi Serasah Daun Trembesi (*Samanea saman*) dengan Penambahan Inokulum Kapang, 3(1), 17–21.
- Hert, D. G., Fredlake, C. P., dan Barron, A. E. 2008. Advantages and Limitations of Next-Generation Sequencing Technologies: A Comparison of Electrophoresis and Non-Electrophoresis Methods. *Electrophoresis*. 29(23), 4618–4626. <https://doi.org/10.1002/elps.200800456>.
- Houbraken, J., Vries, R.P., Samson, R.A. 2014. Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. *Advances in Applied Microbiology*. Vol. 86 : 199-249.
- Izumitsu, K. 2012. Rapid and Simple Preparation of Mushroom DNA Directly from Colonies and Fruiting Bodies for PCR. *Mycoscience*, 396–401. <https://doi.org/10.1007/s10267-012-0182-3>.
- Jamsari. 2008. Preparasi DNA Spesies *Colletotricum* sp. dan Spesifitas Sisten Fingerprinting RAPD. *Jurnal Natur Indonesia*. Vol 11(1) : 31-39.
- Joko, T., Kusumandari, N., dan Hartono, S. 2011. Optimization of PCR Method FOR The Detection of *Pectobacterium carotovorum*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 17(2), 54–59.
- Jumiyati, Bintari, S. H., dan Mubarak, I. 2012. Isolasi dan Identifikasi Khamir Secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. *Biosantifika*, 4(1), 27–35. <http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/biosaintifika>.
- Kashem, M. A., Manchur, M. A., Rahman, M. S., dan Anwar, M. N. 2004. Effect of Carbon and Nitrogen Sources on The Production of Reducing Sugars, Extra-Cellular Protein, and Cellulolytic Enzymes by Two Cellulolytic Bacterial Isolates. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(10), 1660–1663. <http://www.pjbs.org>.
- Korabecna, M. 2007. The Variability in The Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): ITS Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 108(43), 783–787. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3617>.
- Kumar, N. V., Rani, M. E., Gunaseeli, R., Kannan, N. D., dan Sridhar, J. 2012. Modeling and Structural Analysis of Cellulases Using *Clostridium thermocellum* as Template Abstract. 8(22), 1105–1110. [http:// www.bioinformation.net](http://www.bioinformation.net).
- Kurtzman C. P., Piskur, J. 2005. Taxonomy and Phylogenetic Diversity among The Yeast. Vol. 15: 29-46. <https://doi.org/10.1007/b106654>.
- Martin, K. J., dan Rygiewicz, P. T. 2005. Fungal-Specific PCR Primers Developed for Analysis of The ITS Region of Environmental DNA Extracts. *BMC Microbiology*, 2(5), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>.
- Meryandini, A., Widosari, W., Maranatha, B., Sunarti, T. C., Rachmania, N., dan Satria, H. 2009. Isolasi Bakteri Selulolitik dan Karakterisasi Enzimnya. Vol

- 13(1): 33-38.
- Metin, K., Koc, O., Ateslier, B.B., dan Biyik, H.H. 2010. Purification and Characterization of α -amylase Produced by *Penicillium citrinum* HBF62. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9(45) : 7692-7701.
- Mishra, I.G., Tripathi, N., Tiwari, S. 2014. A Simple and Rapid DNA Extraction Protocol for Filamentous Fungi Efficient for Molecular Studies. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol.13: 536-539.
- Mueller, G. M., Bills, G. F., dan Foster, M. S. 2004. *Biodiversity of Fungi*. USA: Elsevier.
- Mueller, G.M., dan Schmit, J.P. 2007. Fungal Biodiversity: What do we know? What can we predict?. *Biodivers Conserv*. 16: 1-5.
- Mulyatni, A. S., Priyatmojo, A., dan Purwantara, A. 2011. Sekuen Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA Ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan Jamur Sekerabat Pembanding. *Menara Perkebunan*, 79(1), 1–5.
- NanoDrop 1000 spectrophotometer V3.7 user's manual. 2008. Wilmington, Delaware USA: Thermo Fisher Scientific Inc. Retrieved from www.nanodrop.com.
- National Enzyme Company. 2012. Enzyme Market Review. USA. Pages: 1-11.
- Naveenkumar, K., dan Thippeswamy, B. 2013. Isolation and Screening of Potential Cellulolytic Fungi from Areca Nut Husk Waste. 8: E 125-132
- Novel, S. S., Nuswantara, S., dan Sarif, S. 2010. *Genetika Laboratorium* (first edition). Jakarta: CV. Trans Info Media.
- Nugroho, T. T., Rambe, E., Dewi, A., Fitri, R. M., Sepryani, H., Restuhadi, F., dan Haryani, Y. 2013. Optimasi Isolasi dan Amplifikasi ITS DNA Ribosomal Fungi Karbolitik Isolat Zona Inti Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*, 407–412.
- Nurfitriani, S., Handayanto, E. 2017. Dekomposisi Kulit Kopi oleh Bakteri Selulolitik yang Diisolasi dari Timbunan Kulit Kopi di Perkebunan Kalibendo Jawa Timur. *Jurnal Tanah dan Sumberdaya Lahan*. Vol4(2): 503-514.
- Nurhayati, S., Hermanto, S., Las, T., Hendrawati, dan Sugoro, I. 2013. Gamma oleh Mikroba Air Formasi. *Seminar Nasional Sains dan Teknologi Nuklir PTNBR – BATAN Bandung*, 231–235.
- Pakpahan, S., Sampoerno, dan Yosefa, S. 2015. Pemanfaatan Kompos Solid dan Mikroorganisme Selulolitik dalam Media Tanam PMK pada Bibit Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) di Pembibitan Utama, *JOM Faperta Vol*, 2(2), 1-15.
- Pitarini, D. 2014. Isolasi Jamur Selulolitik dalam Batubara Serta Uji Aktifitas Selulolitiknya Pada Berbagai pH. *Tugas Akhir*. Malang.
- Porter, T.M., dan Golding, G.B. 2011. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons?. 192: 775-782. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03838.x>.
- Purnamasari, M. I., Prihatna, C., Gunawan, A.W., dan Suwanto, A. 2012. Isolasi dan Identifikasi Secara Molekuler *Ganoderma* spp . yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit. *Journal Fitopatol Indonesia*, 8, 9–15. <https://doi.org/10.14692/jfi.8.1.9>

- Rahayu, F., Saryono, dan Nugroho. T. T. 2015. Isolasi DNA dan Amplifikasi PCR Daerah ITS rDNA Fungi Endofit Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*) LBKURCC69. *X Simpósio Brasileiro de Automação Inteligente (SBAI). JOM FMIPA*, 27(25), 261–265. <https://doi.org/10.1039/b908937c>.
- Rambe, E., Restuhadi, F., dan Nugroho T. T. 2014. Amplifikasi DNA dan Sekuensing Daerah ITS-1 rDNA *Trichoderma Sp* . LBKURCC22. *J. Ind.Che.Acta*, 4(2), 41–47.
- Rathnan, R. K., John, D., dan Balasaravanan, T. 2013. Isolation, Screening, Identification and Optimized Production of Extracellular Cellulase From *Bacillus Subtilis* Using Cellulosic Waste As Carbon Source. *Journal of Microbiology, Biotechnology, and Food Sciences*, 2(6), 2383–2386.
- Rismijana, J., Indriani, I. N., dan Pitriyani, T. 2003. Penggunaan Enzim Selulase-Hemiselulase pada Proses Deinking Kertas Koran Bekas. *Jurnal Matematika dan Sains*, 8(2), 67–71.
- Ristaino, J. B., Madritc, M., Trout, C. L., dan Parra, G. 1998. PCR Amplification of Ribosomal DNA for Species Identification in The Plant Pathogen Genus. *Phytophthora. Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 948–954.
- Sandy, A. Y., Djauhari, S., dan Sektiono, A. W. 2015. Identifikasi Molekuler Jamur Antagonis *Trichoderma Harzianum* Diisolasi dari Tanah. *Jurnal HPT*, 3(3), 1–8.
- Santos, T. C., Gomes, D. P. P., Bonomo, R. C. F., dan Franco, M. 2012. Optimisation of Solid State Fermentation of Potato Peel for The Production of Cellulolytic Enzymes. *Food Chemistry*, 133(4), 1299–1304. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.115>.
- Schoch, C. L., dkk. 2012. Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region As a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Microbiology*, 109(16), 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>.
- Sette, L. D., Passarini, M. R., Delarmelina, Z. C., Salati, F., Duarte, M. C. T. 2006. Molecular Characterization and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi from Coffee Plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(11), 1185–1195. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9160-2>.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tulsiyan, R.K., Sinha, N.K., dan Kumar, V. 2017. Isolation and Identification of Fungi from Coal Mines near Hazaribagh and their Diversity Study. *Journal of Science and Apoptosis*. Vol. 1. Issue. 1: 1-3.
- Umesha, S., Manukumar, H. M., dan Raghava, S. 2016. A Rapid Method for Isolation of Genomic DNA from Food-Borne Fungal Pathogens. *Biotech*, 6(123), 1-9. <http://doi.org/10.1007/s13205-016-0436-4>.
- Vu. D., dkk. 2016. DNA barcoding analysis of more than 9 000 yeast isolates contributes to quantitative thresholds for yeast species and genera delimitation. *Studies in Mycology*. 85: 91-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.007>.
- Xu, J. 2016. *Fungal DNA Barcoding*. NRC Ressearch Press. Vol 59 : 913-932.
- Yan-Lin, S., Wan-Geun, P., Oh-Woung, K., dan Soon-Kwan, H. 2010. The Internal Transcribed Spacer rDNA Specific Markers for Identification of

Zanthoxylum piperitum. *African Journal of Biotechnology*, 9(37), 6027–6039. <https://doi.org/10.5897/AJB10.746>.

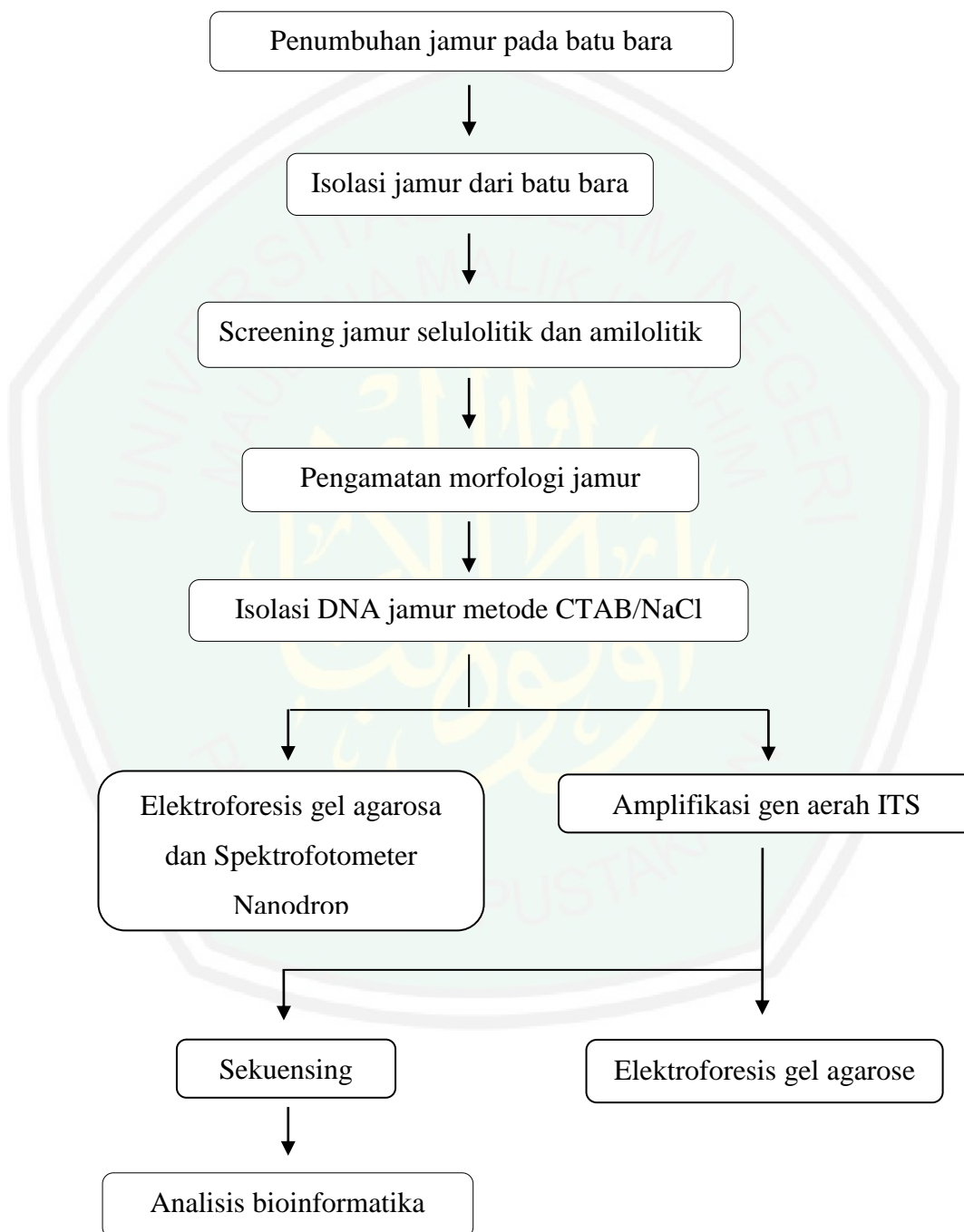
Yulistia, L., Munawar, dan Wdjajanti, H. 2015. Biodiversitas Bakteri dari Limbah Abu Batubara Asal Pabrik Minyak Goreng di Kumai, Kalimantan Tengah. *PROS SEM NAS MA BIODIV INDON*, 1(6), 1302–1306. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/nas.150607>.

Zuhriana, Y. K. 2010. Polymerase Chain Reaction (PCR). Vol. 5(6), 1-6.



LAMPIRAN

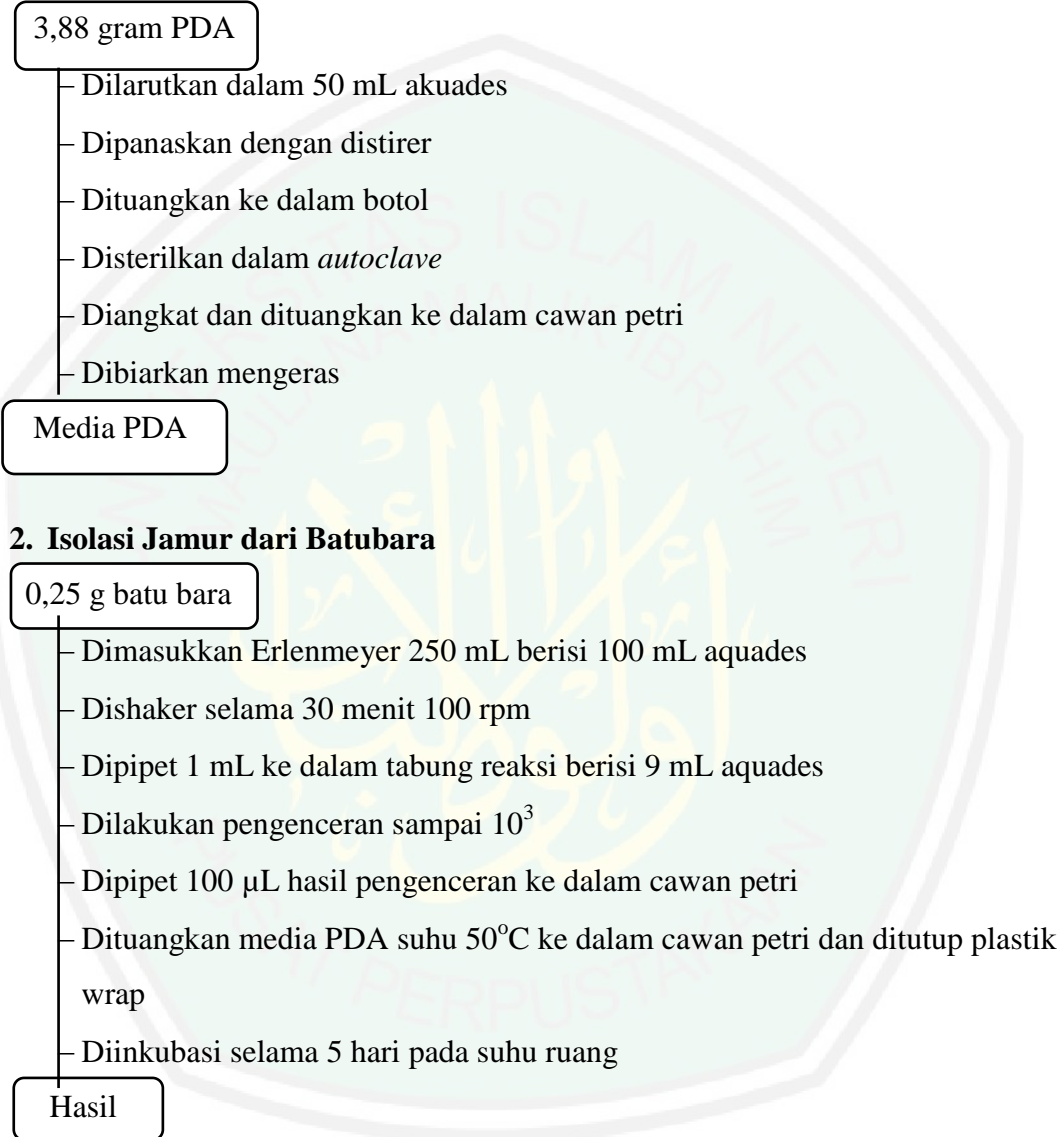
Lampiran 1. Rancangan Penelitian



Lampiran 2. Diagram Alir

1. Preparasi Sampel

Pembuatan media PDA (*Potato Dextrose Agar*)



3.

Screening Jamur Selulolitik

1 ose Jamur

- Digoreskan 1 ose jamur pada media PDA+CMC
- Diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang
- Ditetesi *Congo red* 0,1% dan NaCl 1M
- Diamati zona bening di sekitar koloni

Hasil

4. Screening Jamur Amilolitik

1 ose Jamur

- Digoreskan 1 ose jamur pada media PDA+Starch 1%
- Diinkubasi selama 5 hari pada suhu ruang
- Ditetesi larutan Iodin
- Diamati zona bening di sekitar koloni

Hasil

5. Pengamatan Morfologi Jamur

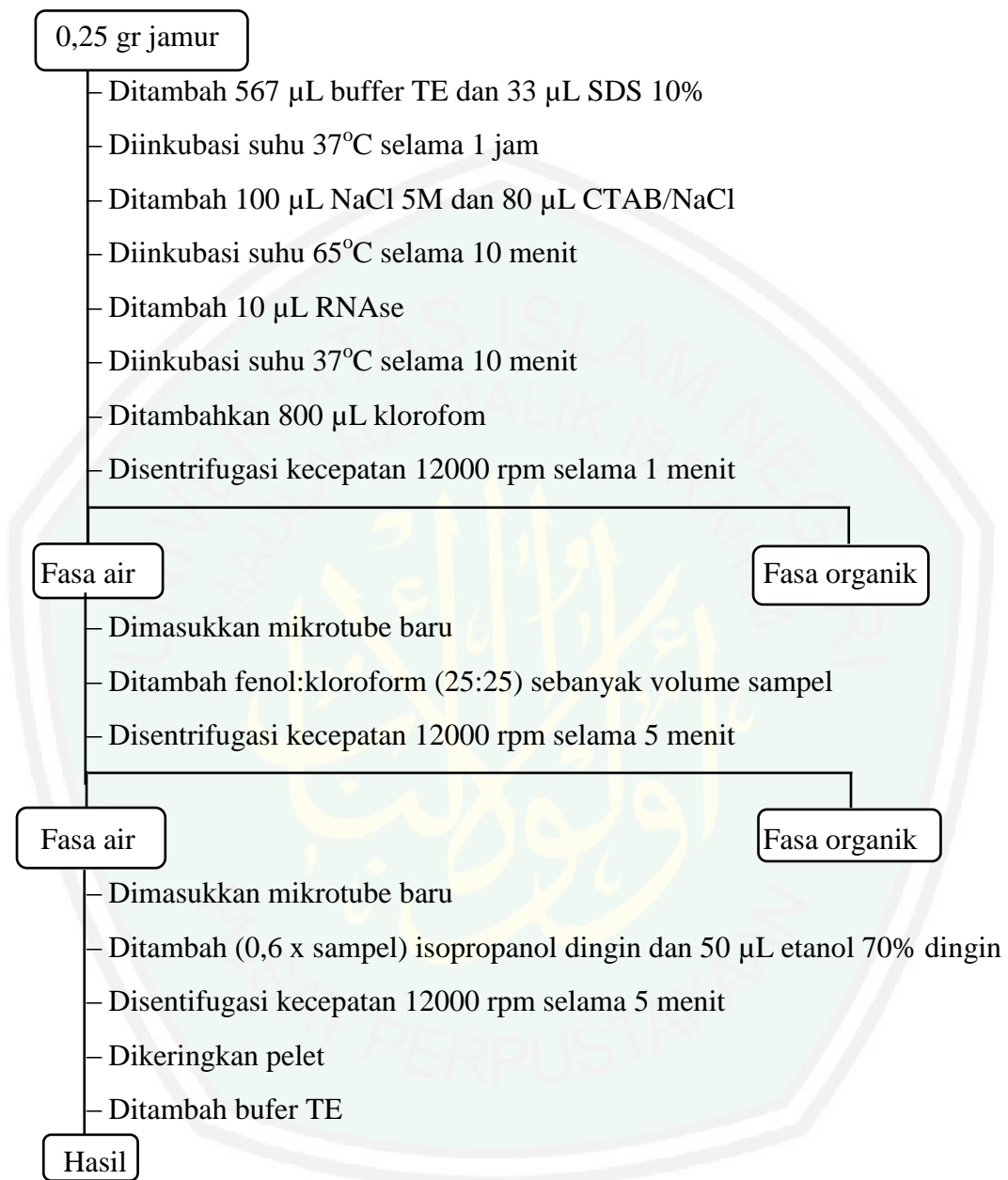
Jamur

- Diamati secara makroskopik (bentuk koloni, warna, tekstur, tepian, dan elevasi koloni)
- Diamati secara mikroskopik (bentuk sel, bentuk hifa, bentuk spora, dan ada tidaknya septat)

Hasil

6.

Isolasi DNA Metode CTAB/NaCl



7.

Elektroforesis Gel Agarosa

0,35 gram Agarosa

- Dilarutkan dalam 35 mL bufer TAE
- Dimasukkan dalam *microwave* selama 3 menit
- Dituang ke dalam *tray* dan ditambah 1 μL larutan EtBr
- Dipasang *well-forming combs*
- Dibiarkan 30 menit hingga gel mengeras
- Dilepas *well-forming combs*

Gel agarosa 1%

- Direndam dalam larutan bufer TAE
- Dimasukkan 3 μL sampel ke dalam sumur dan 1 μL *loading dye buffer*
- Dihubungkan dengan arus listrik
- Dijalankan selama 60 menit dengan tegangan 65 Volt
- Diletakkan gel pada UV transiluminator

Hasil

8. Amplifikasi Gen Daerah ITS dengan PCR

1,2 μL Sampel DNA

- Dipipet kedalam tube PCR berisi 23,5 μL master mix PCR
- Ditambahkan 1,2 μL forward primer
- Ditambahkan 1,2 μL reverse primer
- Divortex
- Dipasang dalam instrument PCR
- Diseting alat sesuai suhu dan durasi proses amplifikasi
- Dikeluarkan tube dari alat
- Dianalisis elektroforesis gel agarosa

Hasil

Lampiran 3. Perhitungan Bahan

1. Pembuatan Media

a. Media PDA+CMC 1%

Media PDA 3,8 gram dan 1 gram CMC dilarutkan dalam 100 mL aquades. Media PDA+CMC 1% dipanaskan sampai mendidih dengan distirer. Dituangkan ke dalam botol dan ditutup rapat kemudian disterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C, 1 atm, selama 1,5 jam.

b. Media PDA+Starch 1%

Media PDA 3,8 gram dan 1 gram CMC dilarutkan dalam 100 mL aquades. Media PDA+Starch 1% dipanaskan sampai mendidih dengan distirer. Dituangkan ke dalam botol dan ditutup rapat kemudian disterilisasi dengan autoklaf suhu 121°C, 1 atm, selama 1,5 jam.

2. Pembuatan NaCl 5 M

$$M = \text{mol}/V \text{ (L)}$$

$$\text{Mol} = M \times V \text{ (L)}$$

$$\text{Mol} = \text{Massa (gram)}/M_r$$

$$\text{mol} = 5 \text{ M} \times 0,01 \text{ L}$$

$$= 0,05 \text{ mol}$$

$$0,05 \text{ mol} = \text{massa (gr)} / 58,44 \text{ gr/mol}$$

$$\text{Massa} = 0,05 \text{ mol} \times 58,44 \text{ gr/mol}$$

$$= 2,922 \text{ gr}$$

Pembuatam NaCl 5M dengan menimbang NaCl sebanyak 2,922 gram. Dilarutkan dalam 10 mL aquades. Dimasukan dalam labu ukur 10 mL dan ditandabatkan kemudian dihomogenkan.

3. Pembuatan Bufer TE (Tris-EDTA)

- 10 mM Tris-Cl pH 7,5
- 1 mM EDTA pH 8,0

<u>1000 mM Tris-Cl</u>	<u>500 mM EDTA</u>
(Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	(Diaminoethane tetraacetic acid)
60,57 g dalam 500 mL ddH ₂ O	14,612 gram dalam 100 mL ddH ₂ O
pH 7,5 (dengan penambahan HCl)	pH 8,0 (dengan penambahan NaOH)

Bufer TE dibuat dari larutan stok Tris-Cl 1000 mM (pH 7,5) dan larutan stok EDTA 500 mM (pH 8,0). Sebanyak 0,02 mL Tris-Cl 1000 mM dan 0,004 mL EDTA 500 mM diencerkan sampai 2 mL dengan ddH₂O.

4. Pembuatan SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) 10%

Larutan dibuat dengan melarutkan 0,5 gram SDS dalam 5 mL aquades. Pembuatan SDS dilakukan pada suhu 65°C dikarenakan SDS tidak mudah larut dalam air dingin.

5. Pembuatan Bufer TAE 1X

Pembuatan stok bufer TAE 50X dengan mencampurkan 24,2 gram Tris-base, 5,7 mL Asam Asetat Glasial, 1,46 gram EDTA. Semua bahan dilarutkan dalam aquades hingga volume mencapai 100 mL. Ditandabatkan menggunakan labu ukur 100 mL. Bufer TAE 1X dibuat dengan memipet 10 mL Bufer TAE 50X dan diencerkan hingga 500 mL.

6. Pembuatan Gel Agarosa 1%

Pembuatan gel agarosa 1% dengan melarutkan 0,35 gram Agarosa dalam 35 mL Bufer TAE 1X. Larutan dipanaskan dengan menggunakan *microwave* dengan power 40 W selama 1 menit. Pemanasan diulangi dua kali hingga agarosa larut dan kemudian dituang dalam cetakan dan ditambahkan 1 µL larutan EtBr.

7.

Komposisi Master Mix PCR

Konsentrasi awal	Volume (μL)	Konsentrasi akhir
10x Vi Buffer A	5,0	1x
2 mM dNTP mix	2,0	0,08 mM
50 mM MgCl ₂	1,5	1,5 mM
5 U/ μ L Taq Polimerase	0,4	2 U/ μ L
Nuclease free water	38,1	-
Total	47,0	-



Lampiran 4. Data Pengamatan

Data Indeks Selulolitik dan Amilolitik Isolat A dan Isolat K

A. Indeks Selulolitik

Isolat	Diameter Koloni (mm)	Diameter Zona Bening (mm)	Indeks Selulolitik
A	14	16	1,14
K	7	8	1,14

B. Indeks Amilolitik

Isolat	Diameter Koloni (mm)	Diameter Zona Bening (mm)	Indeks Amilolitik
A	30	40	1,33
K	16	16	1,0

C. Data Nanodrop sampel DNA hasil Isolasi Metode CTAB/NaCl

Ulangan	A260 nm	A280 nm	A260/A280	Konsentrasi (ng/ μ L)
U1	5,75	2,81	2,05	287,39
U2	5,42	2,68	2,02	270,77
U3	5,39	2,74	1,97	269,53

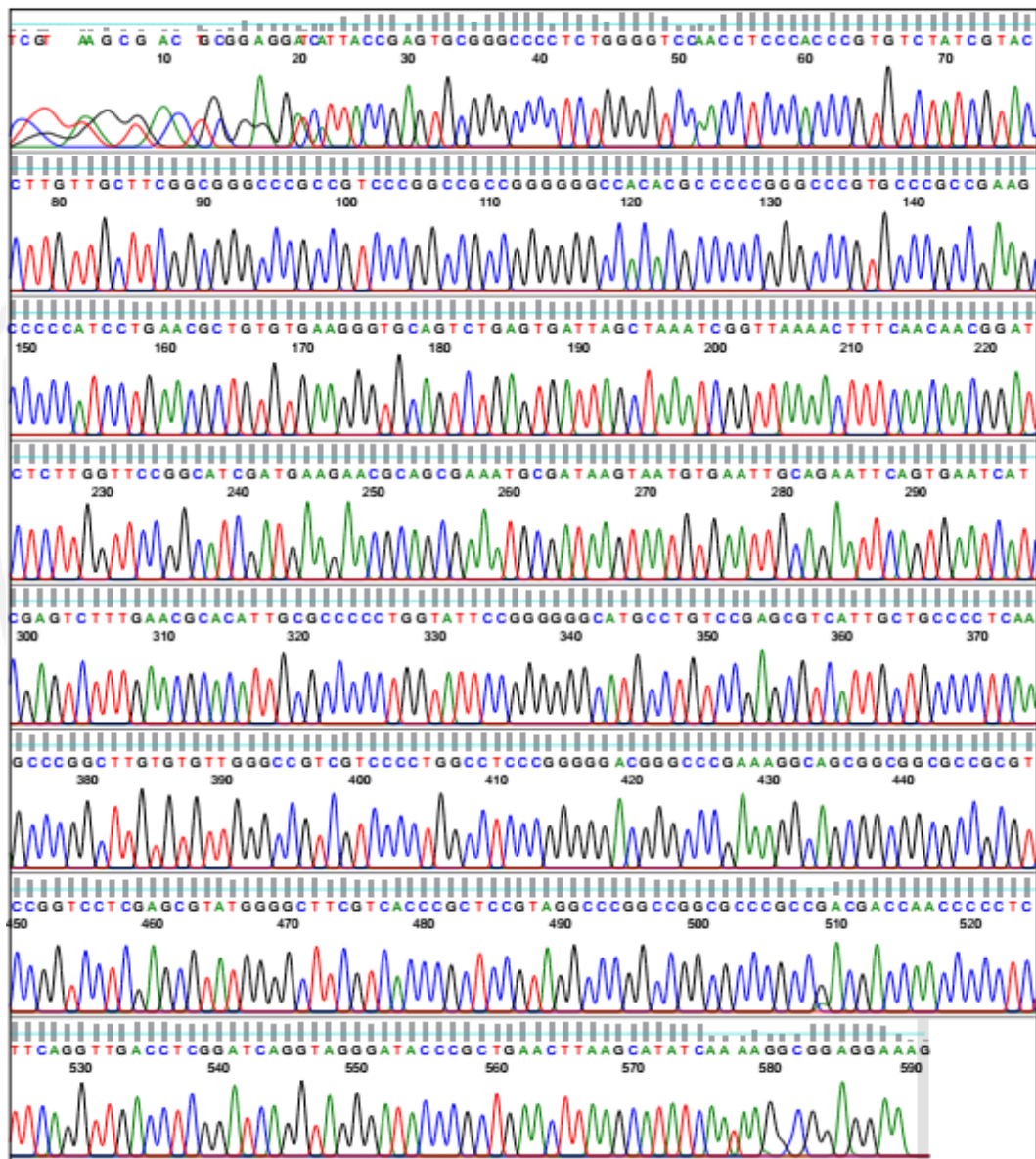
Lampiran 5. Data *Pairwise Distance*

Sekuen	<i>Pairwise Distance</i>						<i>Identity</i>
ITS_Sequence_Isolat_A_BTBR	0,044						95,61078
Penicillium_simplicissimum_HQ607882.1	0,063	0,041					93,69153
Penicillium_ornatum_JX841244.1	0,053	0,041	0,049				94,66146
Penicillium_sublateritium_JX841245.1	0,075	0,049	0,053	0,063			92,45778
Penicillium_chrysogenum_KJ527440.1	0,049	0,004	0,041	0,041	0,046		95,12768
Penicillium_janthinellum_KM268642.1	0,049	0,004	0,041	0,041	0,046	0,000	95,12768
Penicillium_janthinellum_KM268662.1	0,049	0,004	0,041	0,041	0,046	0,000	95,12768
Penicillium_janthinellum_KM268667.1	0,049	0,004	0,041	0,041	0,046	0,000	95,12768
Penicillium_janthinellum_KM268668.1	0,049	0,004	0,041	0,041	0,046	0,000	95,12768
Penicillium_janthinellum_KM268669.1	0,049	0,004	0,041	0,041	0,046	0,000	95,12768
Penicillium_janthinellum_KM268707.1	0,049	0,004	0,041	0,041	0,046	0,000	95,12768
Penicillium_janthinellum_KM268710.1	0,046	0,011	0,049	0,044	0,053	0,016	95,3641
Penicillium_janthinellum_KM268714.1	0,044	0,009	0,046	0,041	0,051	0,014	95,5997
Penicillium_cremeogriseum_KU933446.1	0,046	0,011	0,049	0,044	0,053	0,016	95,35757
Penicillium_ludwigii_KY606537.1	0,063	0,041	0,000	0,049	0,053	0,041	93,69153
Penicillium_ornatum_NR_138306.1	0,049	0,009	0,041	0,046	0,044	0,014	95,13779
Penicillium_javanicum_U18358.1	0,331	0,323	0,309	0,316	0,312	0,319	66,93556
Chaetomium_globosum_AY429056.1							

Lampiran 6. Kromatogram Sekuensing

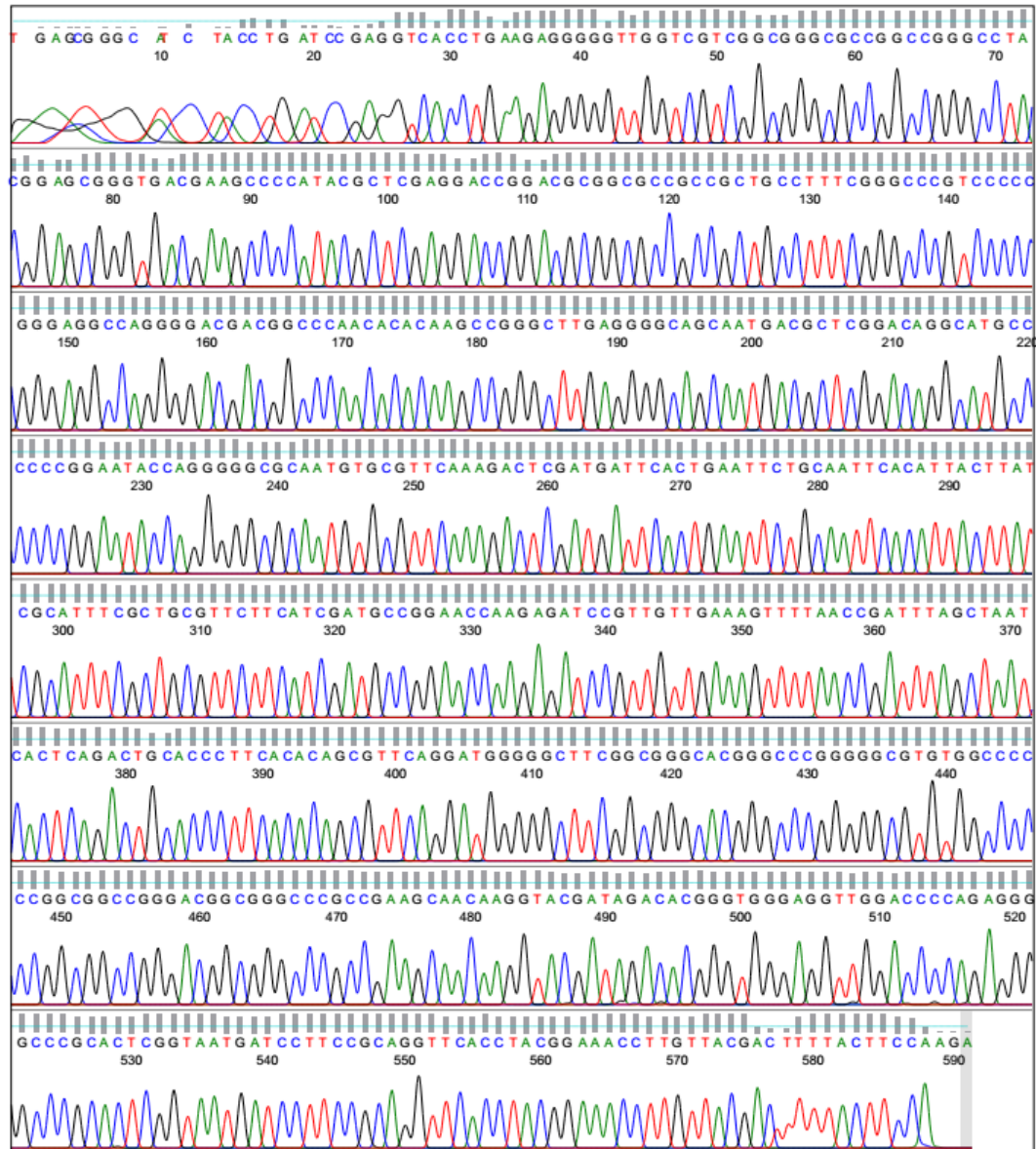
Sample Name: 3062976_Sampel_ITS_5
 Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 15.0727
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1544, C = 2624, G = 1884, T = 1630
 Lane/Cap#: 4
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Sample Name: 3062975_Sampel_ITS4
 Mobility: KB_3730_POP7_BDTv3.mob
 Spacing: 14.9875
 Comment: n/a

Signal Strengths: A = 1771, C = 2324, G = 1661, T = 1264
 Lane/Cap#: 6
 Matrix: n/a
 Direction: Native



Lampiran 7. Alignment Sekuen Isolat A BTBR

```

ITS Sequen -----
HQ607882.1 -----
JX841244.1 -----GTGAGG CCTTCGGACT
JX841245.1 CACCGCCCGT CGCTACTACC GATTGAATGG CTCAGTGAGG CCTTCGGACT
KJ527440.1 -----
KM268642.1 -----
KM268662.1 -----
KM268667.1 -----
KM268668.1 -----
KM268669.1 -----
KM268707.1 -----
KM268710.1 -----
KM268714.1 -----
KU933446.1 -----
KY606537.1 -----
NR_138306. -----GTGAGG CCTTCGGACT
U18358.1 P -----
AY429056.1 -----

ITS Sequen -----
HQ607882.1 -----
JX841244.1 GGC-TCAGGA GGGTTGGCAA CGACCCTCCA GAGCCGAAA GTTGGTCAAA
JX841245.1 GGCCTCAGGA GGGTTGGCAA CGACCCCCC GAGCCGAA- GTTGGTCAAA
KJ527440.1 -----
KM268642.1 -----
KM268662.1 -----
KM268667.1 -----
KM268668.1 -----
KM268669.1 -----
KM268707.1 -----
KM268710.1 -----
KM268714.1 -----
KU933446.1 -----
KY606537.1 -----
NR_138306. GGC-TCAGGA GGGTTGGCAA CGACCCTCCA GAGCCGAAA GTTGGTCAAA
U18358.1 P -----
AY429056.1 -----

ITS Sequen -----TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
HQ607882.1 -----GGAAGT AAAAG--TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
JX841244.1 CTCGGTCATT TAGAGGAAGT AAAAG--TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
JX841245.1 CTCGGTCATT TAGAGGAAGT AAAAG--TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KJ527440.1 -----GTT TCCGTAGG-T
KM268642.1 ---TGGAAGT AAAAA--TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KM268662.1 -----TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KM268667.1 ---TGGAAGT AAAAAA-TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KM268668.1 -----TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KM268669.1 ---TGGAAGT AAAAAA-TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KM268707.1 ---TTGAAGT AAAAAAATCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KM268710.1 ---GGAAGT AAAAAG-TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KM268714.1 ---TGGAAGT AAAAAAGTCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
KU933446.1 -----GGTT TCCGTAGG-T
KY606537.1 -----CT TCCGTAGGTT
NR_138306. CTCGGTCATT TAGAGGAAGT AAAAG--TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T
U18358.1 P -----AAGT AAAAG--TCG TAACAAGGTT TCCGTAGG-T

```


AY429056.1 -----GGC CGCGAATTCA CTA-GTGATT TCCGTAGG-T

ITS Sequen GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGCG GGCCCTCTG GGTCCAACC
 HQ607882.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 JX841244.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGCG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 JX841245.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCC-- GGTCCAACC
 KJ527440.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KM268642.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KM268662.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KM268667.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KM268668.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KM268669.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KM268707.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KM268710.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KM268714.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KU933446.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 KY606537.1 GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 NR_138306. GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGCG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 U18358.1 P GAACCTGCGG AAGGATCATT ACCGAGTGAG GGCCCTCT-- GGTCCAACC
 AY429056.1 GAACCTGCGG AGGGATCATT ACAGAGTTGC AAAACTCC-- ----CTAAAC

ITS Sequen TCCCACCCGT GTCTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTCC
 HQ607882.1 TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCC-TCA
 JX841244.1 TCCCACCCGT GTCTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTC-
 JX841245.1 TCCCACCCGT GTCTACCGTA CCGTGTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTC-
 KJ527440.1 TCCCACCCGT GTTTATTTTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCTTAA
 KM268642.1 TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTTT
 KM268662.1 TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTTT
 KM268667.1 TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTTT
 KM268668.1 TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTTT
 KM268669.1 TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTTT
 KM268707.1 TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTTT
 KM268710.1 TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTTT
 KM268714.1 TCCCACCCGT GTTTATCATA CCTAGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTCA
 KU933446.1 TCCCACCCGT GTTTATCATA CCTAGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTCA
 KY606537.1 TCCCACCCGT GTTTATCATA CCTAGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTCA
 NR_138306. TCCCACCCGT GTCTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTC-
 U18358.1 P TCCCACCCGT GTTTATCGTA CCTTGTTGCT TCGGCGGGC- -CCGCCGTCA
 AY429056.1 CATTGTGAAC GTTACCTAAA CC--GTTGCT TCGGCGGGCG GCCCGGGGT

ITS Sequen -CGGCCGCCG GGGGGCACA CGCCCCGGG CCCGTGCCCC CCGAAGCCCC
 HQ607882.1 -CGGCCGCCG GGGGGC-ACC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 JX841244.1 -TGGCCGCCG GGGGGC-CTC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 JX841245.1 -TGGCCGCCG GGGGGC-GTT CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACCC
 KJ527440.1 CTGGCCGCCG GGGGGC-TTA CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 KM268642.1 -CGGCCGCCG GGGGGC-ATC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 KM268662.1 -CGGCCGCCG GGGGGC-ATC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 KM268667.1 -CGGCCGCCG GGGGGC-ATC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 KM268668.1 -CGGCCGCCG GGGGGC-ATC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 KM268669.1 -CGGCCGCCG GGGGGC-ATC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 KM268707.1 -CGGCCGCCG GGGGGC-ATC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 KM268710.1 -CGGCCGCCG GGGGGC-ATC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 KM268714.1 -TGGCCGCCG GGGGGC-ACC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGCCCC
 KU933446.1 -TGGCCGCCG GGGGGC-ACC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGCCCC
 KY606537.1 -TGGCCGCCG GGGGGC-ACC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 NR_138306. -TGGCCGCCG GGGGGC-CTC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC
 U18358.1 P -TGGCCGCCG GGGGGC-ACC CGCCCCGGG CCCGCGCCCC CCGAAGACAC

AY429056.1 TTACCCCCCG GCGCCCCCTG GGCCCCACCG CGGGCGCCCC CCGGAGGTCA

ITS Sequen CATCTGAAC GCTGTGTGAA GGGTG--CAG TCTGAGT--G ATTAGCTAAA
 HQ607882.1 CAT--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGCA-G ATTAGCTAAA
 JX841244.1 CGC--CGAAC TCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGCG-A TT-TACGAAA
 JX841245.1 CCTG-TGAAC GCTGTCTGAA GCTTG--CAG TCTGAGCG-A AAACGCATAA
 KJ527440.1 CCT--CGAAC TCTGTCTGAA GATTG--TAG TCTGAGT--G AAAATATAAA
 KM268642.1 CAT--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KM268662.1 CAT--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KM268667.1 CAT--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KM268668.1 CAT--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KM268669.1 CAT--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KM268707.1 CAT--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KM268710.1 CAT--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KM268714.1 CCC--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CTG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KU933446.1 CCC--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 KY606537.1 CC--TGAAC GCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGC--G ATTAGCTAAA
 NR_138306. CGC--CGAAC TCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGCG-A TT-TACGAAA
 U18358.1 P CAT--TGAAC TCTGTCTGAA GATTG--CAG TCTGAGT--G ATTAGCTAAA
 AY429056.1 C--CAAAC TCTTGATAAT TTATGGCCCTC TCTGAGTCTT CTGTACTGAA

ITS Sequen TCGGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 HQ607882.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 JX841244.1 TTAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 JX841245.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KJ527440.1 TTATTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KM268642.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KM268662.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KM268667.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KM268668.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KM268669.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KM268707.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KM268710.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KM268714.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KU933446.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 KY606537.1 TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 NR_138306. TTAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 U18358.1 P TCAGTTAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA
 AY429056.1 TAAGTCAAAA CTTTCAACAA CGGATCTCTT GGTTCGGCA TCGATGAAGA

ITS Sequen ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 HQ607882.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 JX841244.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 JX841245.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAC TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KJ527440.1 ACGCAGCGAA ATGCGATACG TAATGTGAAT TGCA-AATTC AGTGAATCAT
 KM268642.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KM268662.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KM268667.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KM268668.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KM268669.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KM268707.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KM268710.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KM268714.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KU933446.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 KY606537.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 NR_138306. ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT
 U18358.1 P ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAAATTC AGTGAATCAT

AY429056.1 ACGCAGCGAA ATGCGATAAG TAATGTGAAT TGCAGAATTC AGTGAATCAT

ITS Sequen CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 HQ607882.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 JX841244.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 JX841245.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KJ527440.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KM268642.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KM268662.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KM268667.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KM268668.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KM268669.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KM268707.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KM268710.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KM268714.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KU933446.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 KY606537.1 CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 NR_138306. CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 U18358.1 P CGAGTCTTTG AACGCACATT GCGCCCCCTG GTATTCCGGG GGGCATGCCT
 AY429056.1 CGAATCTTTG AACGCACATT GCGCCCCTG GTATTCTGGC GGGCATGCCT

ITS Sequen GTCCGAGCGT CATTGCTGCC CCTCAAGCCC G-GCTTGTGT GTTGGGCCGT
 HQ607882.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 JX841244.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCGC
 JX841245.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCCC G-GCTTGTGT GTTGGGCCGC
 KJ527440.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KM268642.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KM268662.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KM268667.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KM268668.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KM268669.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KM268707.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KM268710.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KM268714.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KU933446.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 KY606537.1 GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 NR_138306. GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCGC
 U18358.1 P GTCCGAGCGT CATTGCTGCC C-TCAAGCAC G-GCTTGTGT GTTGGGCCCC
 AY429056.1 GTTCGAGCGT CATTTC AAC A-TCAAGCCC CCGGGCTTGT GTTGGG----

ITS Sequen CGTCCCCTGG CCTCCCGGGG GACGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 HQ607882.1 CGCCCCCGA C-T-CCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 JX841244.1 CGTCCCCT-- C-TCCCGGGG GACGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGA
 JX841245.1 CGTCCCCCGG C-TCCCGGGG GACGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KJ527440.1 -GTCCCTCCGA --TCCCGGGG GACGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KM268642.1 -GCCCCCGG C-TACCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KM268662.1 -GCCCCCGG C-TACCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KM268667.1 -GCCCCCGG C-TACCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KM268668.1 -GCCCCCGG C-TACCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KM268669.1 -GCCCCCGG C-TACCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KM268707.1 -GCCCCCGG C-TACCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KM268710.1 -GCCCCCGG C-TACCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KM268714.1 CGCCCCCGG C-TCCCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KU933446.1 CGCCCCCGG C-TCCCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 KY606537.1 CGCCCCCGG C-TCCCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC
 NR_138306. CGTCCCCT-- C-TCCCGGGG GACGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGA
 U18358.1 P CGCCCCCGG --TCCCGGGG GCGGGGCCCC AAAGGCAGCG GCGGCACCGC

AY429056.1 -GACCTGCGG C-TGCCGCAG GCC----CTG AAAAGCAGTG GCGGGCTCGC

ITS Sequen GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCC- GTAGGCCCGG
 HQ607882.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCC- GTAGGCCCGG
 JX841244.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCC- GTAGGCCCGG
 JX841245.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCCT GCAGGCCCGG
 KJ527440.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTTG-- -----
 KM268642.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KM268662.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KM268667.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KM268668.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KM268669.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KM268707.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KM268710.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KM268714.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KU933446.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 KY606537.1 GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 NR_138306. GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCC- GTAGGCCCGG
 U18358.1 P GTCCGGTCCT CGAGCGTATG GGGCTTCGTC ACCCGCTCT- GTAGGCCCGG
 AY429056.1 TGTCA--CAC CGAGCGTAGT AGCATATATC --TCGCTCT- GGGCGTGCTG

ITS Sequen CCGG-CGCCC GCCGACGACC AACCCC---- CTCTTCAGGT TGACCTCGGA
 HQ607882.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTC-CAGGT TGACCTCGGA
 JX841244.1 CCGGTCGCCT GCCGACGACC AATCTT--CC TTCTCCAGGT TGACCTCGGA
 JX841245.1 CCGGTCGCCC GCCGACACTC CACCT----- CTCTCCAGGT TGACCTCGGA
 KJ527440.1 -----
 KM268642.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KM268662.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KM268667.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KM268668.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KM268669.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KM268707.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KM268710.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KM268714.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KU933446.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 KY606537.1 CCGG-CGCCC GCCGGCGACC CCCCTCAATC TTTCCTCAGGT TGACCTCGGA
 NR_138306. CCGGTCGCCT GCCGACGACC AATCTT--CC TTCTCCAGGT TGACCTCGGA
 U18358.1 P CCGG-CGCCC GCCGGCGACT CCCATCAATC TTTC-CAGGT TGACCTCGGA
 AY429056.1 CCGG-TTCCG GCCGTAAAC CACCTT--TT AACCCAAGGT TGACCTCGGA

ITS Sequen TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATC-----
 HQ607882.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG CGGAGGA---
 JX841244.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG CGGAGGAAAA
 JX841245.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG CGGAGGAAAA
 KJ527440.1 -----
 KM268642.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG CCGGAGGAA-
 KM268662.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATA-- -----
 KM268667.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATA-- -----
 KM268668.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG CCGGAGGA--
 KM268669.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAAAAAG CCGGAGGAA
 KM268707.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG CGGAGGA---
 KM268710.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG GCGGAGGAA
 KM268714.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG CGGAGGAA--
 KU933446.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAA- -----
 KY606537.1 TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAA-----
 NR_138306. TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG CGGAGGAAAA
 U18358.1 P TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA TATCAATAAG -----

AY429056.1 TCAGGTAGGA AGACCCGCTG GACTTAAGCA TATCAATAAG CGGAGGAAAT

ITS Sequen -----
 HQ607882.1 -----
 JX841244.1 GAAACCAACC GGGATTGCC TAGTAACGGC GAGTGAAGCG GCAAGAGCTC
 JX841245.1 GAAACCAACA GGGATTGCCT CAGTAACGGC GAGTGAAGCG GCAAGAGCTC
 KJ527440.1 -----
 KM268642.1 -----
 KM268662.1 -----
 KM268667.1 -----
 KM268668.1 -----
 KM268669.1 -----
 KM268707.1 -----
 KM268710.1 -----
 KM268714.1 -----
 KU933446.1 -----
 KY606537.1 -----
 NR_138306. GAAACCAACC GGGATTGCC TAGTAACGGC GAGTGAA-----
 U18358.1 P -----
 AY429056.1 CGAATTC-----

ITS Sequen -----
 HQ607882.1 -----
 JX841244.1 AAATTTGAAA GCTGGCTCCT TCGGGGTCCG CATTGTAATT TGCAGAGGAT
 JX841245.1 AAATTTGAAA GCTGGCCCCC CCGGGGCCCG CGTTGTAATT TGCAGAGGAT
 KJ527440.1 -----
 KM268642.1 -----
 KM268662.1 -----
 KM268667.1 -----
 KM268668.1 -----
 KM268669.1 -----
 KM268707.1 -----
 KM268710.1 -----
 KM268714.1 -----
 KU933446.1 -----
 KY606537.1 -----
 NR_138306. -----
 U18358.1 P -----
 AY429056.1 -----

ITS Sequen -----
 HQ607882.1 -----
 JX841244.1 GCTTCGGGAG CGGCCCCCAT CTAAGTGCCC TGAACGGGC CGTCATAGAG
 JX841245.1 GCTTCGGGAG CGGCCCCCAT CTAAGTGCCC TGAACGGGC CGTCATAGAG
 KJ527440.1 -----
 KM268642.1 -----
 KM268662.1 -----
 KM268667.1 -----
 KM268668.1 -----
 KM268669.1 -----
 KM268707.1 -----
 KM268710.1 -----
 KM268714.1 -----
 KU933446.1 -----
 KY606537.1 -----
 NR_138306. -----
 U18358.1 P -----

```

AY429056.1 -----
ITS Sequen -----
HQ607882.1 -----
JX841244.1 GGTGAGAATC CC-----
JX841245.1 GGTGAGAATC CCGTCTGGGA TGGGGTGCCC GCGCCCGTGT GAAGTCCTT
KJ527440.1 -----
KM268642.1 -----
KM268662.1 -----
KM268667.1 -----
KM268668.1 -----
KM268669.1 -----
KM268707.1 -----
KM268710.1 -----
KM268714.1 -----
KU933446.1 -----
KY606537.1 -----
NR_138306. -----
U18358.1 P -----
AY429056.1 -----

```

```

ITS Sequen -----
HQ607882.1 -----
JX841244.1 -----
JX841245.1 CGACGAGTCG A
KJ527440.1 -----
KM268642.1 -----
KM268662.1 -----
KM268667.1 -----
KM268668.1 -----
KM268669.1 -----
KM268707.1 -----
KM268710.1 -----
KM268714.1 -----
KU933446.1 -----
KY606537.1 -----
NR_138306. -----
U18358.1 P -----
AY429056.1 -----

```

Keterangan :

- Merah : mutasi
- Kuning : insersi
- Biru : delesi
- Hijau : gap