

## Molecular Identification of Endophytic Fungi Isolated from Bidara Root (*Ziziphus Mauritiana* Lam.) Using Polymerase Chain Reaction (Pcr)

Siti Nurlillah Jamaluddin<sup>1</sup>, Fitriana<sup>1</sup>, Sitti Amirah<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, 90231, Indonesia.

<b>Article info</b> Received: 16/07/2023	<b>ABSTRACT</b>
<b>Available online:31/03/2024</b>	<i>The roots of the bidara plant have the potential as antibacterial agents. The antibacterial compounds in the roots of the bidara plant originate from secondary metabolites produced by endophytic compounds known as endophytic fungi. The purpose of this research is to identify the types of endophytic fungi in bidara roots. The identification of microorganisms can be done through morphology or molecular methods. However, morphological identification alone is unable to depict the morphospecies to the phylogenetic level of a microorganism, thus molecular identification using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method is required. This study utilized root isolates from the bidara plant with the sample code IFAZ-6, which, after sequencing, yielded a pair of base pairs measuring 558bp. The results of BLAST and phylogenetic analysis revealed that the IFAZ-6 isolate has a close relationship with the species <i>Clonostachys rosea.</i>, which has been recorded in the database with a 100% identity level.</i>
<b>Corresponding Author:</b> Fitriana Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Universitas Muslim Indonesia, Makassar, South Sulawesi, Indonesia email: <a href="mailto:fitriana.fitriana@umi.ac.id">fitriana.fitriana@umi.ac.id</a>	
<b>Keyword:</b>	<i>Antibacterial, Endophytic Fungi, Polymerase Chain Reaction, The Roots of the bidara.</i>



Copyright ©2024 by Author

Journal Microbiology Science by Faculty of Pharmacy Universitas Muslim Indonesia is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

### PENDAHULUAN

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi merupakan salah satu kemajuan dalam peradaban manusia. Masyarakat sudah semakin maju dengan pola hidup dan tatanan yang berbeda dengan generasi sebelumnya<sup>1</sup>. Berdasarkan perkembangan teknologi tersebut, turut memberikan dampak di bidang kesehatan seperti lahirnya teknologi *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan teknologi yang memiliki kemampuan untuk melipat gandakan fragmen DNA baik itu hewan,

tumbuhan, bakteri, jamur dan virus. Pertama kali ditemukan 40 tahun lalu, teknologi ini mampu memberikan dampak yang cukup signifikan diawal dekade penemuannya terutama pada teknologi kloning gen<sup>2</sup>. Perkembangan teknologi PCR dapat membantu penanganan penyakit – penyakit berbahaya seperti kanker dan penyakit menular. Selain itu, dapat juga digunakan dalam pengurutan kode genetika manusia, identifikasi berbagai jenis obat baru ataupun spesies baru baik itu dari tumbuhan maupun hewan<sup>2</sup>.

Identifikasi spesies – spesies baru dari tumbuhan banyak dilakukan untuk mencari senyawa endofit dari metabolit bioaktif tumbuhan yang mempunyai aktivitas farmakologis seperti antibiotik, antivirus, antikanker, antiinflamasi dan antioksidan<sup>3</sup>. Fungi endofit adalah senyawa endofit tumbuhan sejenis mikroba yang ada di jaringan internal tanaman tanpa menyebabkan infeksi simptomatik pada tanaman inangnya<sup>4</sup>. Identifikasi spesies fungi endofit pada tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan identifikasi morfologi maupun molekuler. Identifikasi morfologi tidak dapat menggambarkan filogeni hingga tingkat spesies sementara identifikasi molekuler mulai dari susunan taksonomi morfospesies, penggambaran filogeni hingga tingkat spesies dapat dilakukan. Oleh sebab itu, untuk mengidentifikasi fungi endofit yang berpotensi sebagai antimikroba dibutuhkan identifikasi molekuler dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) terhadap tumbuhan yang memiliki potensi terapeutik<sup>5</sup>.

Salah satu tumbuhan yang memiliki potensi terapeutik yang baik adalah tanaman bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam). Telah dilaporkan dalam sejumlah penelitian ilmiah yang diterbitkan mengenai kandungan yang dimilikinya. Priyanka *et al*, fungsi endofit dari ekstrak akar bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam.) memiliki spektrum aktivitas

antibakteri yang signifikan. Dalam penelitian lain, dua alkaloid siklik beranggota 14 dan 13 mauritine L dan mauritine M serta tiga alkaloid siklopeptida (nummularines H, B, dan hemsine A dari akar bidara yang tumbuh di Thailand menunjukkan bahwa aktivitas antiplasmodial yang kuat terhadap parasit *Plasmodium falciparum* dengan konsentrasi penghambat (IC<sub>50</sub>) mulai dari 3,7 µM hingga 10,3 µM. Senyawa mauritine M dan nummularines H juga menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan MIC masing-masing adalah 72,8 µM dan 4,5 µM<sup>6,7</sup>.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Khusnul Annisa terhadap 10 isolat akar tanaman bidara, diuji secara ekstraseluler terhadap 10 jenis bakteri diantaranya, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dhysentriae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella thypi*, *Escheria coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Propionibacterium acnes* dan *Vibrio cholerae* isolat yang diberi kode IFAZ-6 menunjukkan aktivitas antibakteri dengan diameter rata-rata zona hambat 6 – 26,20 mm.

Berdasarkan uraian di atas, maka akan dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi spesies fungi endofit akar tanaman bidara IFAZ-6 secara molekuler dan menganalisis apakah fungi endofit

tersebut merupakan spesies baru atau tidak dengan menggunakan analisis filogenetik *The National Center of Biotechnology Information* (NCBI).

## METODE

### Alat dan Bahan

Alat – alat yang digunakan adalah *bead beating tube*, cawan petri, *centrifuge* elektroforesis, *Magnetic stand*, *Software* perangkat lunak MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) dan NCBI (*National Centre for Biotechnology*), tabung *effendorf*, PCR, dan *vortex*.

Bahan – bahan yang digunakan adalah isolat aktif fungi endofit akar tanaman bidara IFAZ-6 (Gambar 1), enzim proteinase K, Quick-DNA Magbead Plus Kit (Zymo Research, D4081), ddH<sub>2</sub>O (9,5 µl), MyTaq HS Red Mix 2x (12,5 µl), Primer ITS1 (1 µl) dan ITS4 (1 µl), DNA Template (1 µl).



**Gambar 1.** Isolat akar tanaman bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam.) IFAZ-6

### Penyiapan Sampel dan Prosedur Penelitian

#### a. Pemurnian Isolat Fungi dan Pemeriksaan Mikroskopik

Isolat akar tanaman bidara (IFAZ-6) dilakukan tahap pemurnian ulang dengan menggunakan cawan petri steril

yang berbeda, tambahkan medium PDA (*Potato Dextrosa Agar*) sebanyak 10 mL. Kemudian digunakan jarum preparat untuk menginokulasi fungi dari isolat IFAZ-6 ke atas medium. Lalu, diinkubasi selama 3 – 7 hari<sup>9</sup>.

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan dengan metode *slide culture* yaitu cawan petri yang berisi kertas saring, batang v, kaca objek dan penutup kaca objek, disterilkan terlebih dahulu di oven selama 2 jam 180°C. Kemudian diambil 1 ose isolat terpilih, pindahkan ke atas kaca objek. Tambahkan 1 tetes medium PDA yang telah diberi asam tartarat, lalu tutup kaca objek. Gunakan gliserol 10% untuk memberi suasana yang lembab pada kertas saring. Kemudian, inkubasi pada suhu ruang selama 3 – 7 hari<sup>9</sup>.

#### b. Ekstraksi DNA

Isolat IFAZ-6 yang telah dimurnikan akan dilakukan pemisahan genom DNA. Pada tahap ini, ekstraksi dan pemurnian DNA dilakukan dengan menggunakan Quick-DNA Magbead Plus Kit (Zymo Research, D4081) dan sesuai dengan instruksi pada kit yang merupakan kit ekstraksi DNA genomik<sup>10</sup>.

#### c. Amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction*

Amplifikasi DNA dilakukan dengan MyTaq™ HS Red Mix Bioline, (BIO-25048) yang telah dimodifikasi,

berlangsung dengan tahap sebagai berikut. Tahap denaturasi awal dilakukan dengan 1 siklus selama 3 menit dengan suhu 95°C. 35 siklus (denaturasi 15 detik 95°C, *annealing* 30 detik 52°C dan *extension* 45 detik 72°C). *Final extension* 3 menit 72°C, pendinginan dengan suhu 4°C selama beberapa saat. Secara keseluruhan, proses PCR dilakukan dengan 38 siklus. Dalam tahapan PCR digunakan ddH<sub>2</sub>O (9,5 µl), MyTaq HS Red Mix 2x (12,5 µl), DNA Template (1 µl), Primer ITS1 (1 µl) dan ITS4 (1 µl). Primer Forward ITS 1 dan Reverse ITS 4 yang secara spesifik akan mengamplifikasi target sebagai berikut:

*Primer Forward:* (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'),

*Primer Reverse:* (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5')

#### d. Uji elektroforesis

1 g agar ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL Buffer TAE kedalam Erlenmeyer, dipanaskan dalam microwave selama 2 menit hingga mendidih, kemudian ditambahkan 8 µL etidium bromida. Cairan gel dituang dalam container pencetak agarose hingga memadat. Dimasukkan 5 µL produk PCR masing – masing sampel yang diamplifikasi ke dalam sumur pada agarose yang terendam dalam tangki yang berisi TAE Buffer<sup>11</sup>.

#### e. Uji sekuensing

Untuk mengetahui susunan basa nukleotidanya, hasil dari purifikasi dikirim ke perusahaan penyedia jasa sekuensing 1st Base melalui perusahaan Biologi Molekuler PT. Genetika Science Indonesia. Sekuen dianalisis dengan bantuan program sekuen yang dilakukan pada perangkat Bioedit

(<http://www.mwgasoftware.net>)<sup>12</sup>.

#### f. Analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*)

Hasil analisis uji sekuen yaitu elektroferogram kemudian dibandingkan dengan gen yang ada dipangkalan data melalui fasilitas *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Susunan residu asam amino penyedia gen diprediksi dengan fasilitas BLAST pada website BLAST<sup>13</sup>. Analisis hasil BLAST tersebut memberikan informasi dan memverifikasi mengenai mikroorganisme yang mempunyai kesamaan dengan urutan DNA sampel sehingga dapat digunakan untuk identifikasi mikroba. Data set sekuen fungi endofit yang berasal dari hasil sekuensing dan BLAST kemudian disejajarkan menggunakan program MUSCLE pada *software* MEGA 10. Informasi dari hasil BLAST tersebut berupa *Query Coverage* dan *Maximum*

*identity*. *Query coverage* merupakan persentasi dari panjang nukleotida yang selaras dengan database yang terdapat pada BLAST sedangkan *Max identity* merupakan nilai tertinggi dari persentasi identitas atau kecocokan antara sekuen query dengan sekuen database yang tersejajarkan<sup>14</sup>.

#### g. Analisis Filogenetika

Informasi dari hasil BLAST kemudian diproses untuk dianalisis filogenetik dengan menggunakan metode *Neighbor Joining Tree*.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat fungi endofit IFAZ-6 dilakukan pemurnian untuk mendapatkan isolat akar fungi endofit yang tunggal<sup>15</sup>. Kemudian, dilakukan pemeriksaan secara mikroskopik untuk melihat morfologi isolat tersebut.

**Tabel 1.** Hasil pemeriksaan mikroskopik fungi endofit IFAZ-6

Kode Sampel	Hifa	Spora
IFAZ-6	Bersekat	Ada

Pada tabel 1, menunjukkan bahwa isolat IFAZ-6 memiliki spora dan hifa yang bersekat (septa). Hifa yang bersekat umumnya dimiliki oleh jamur yang di klasifikasikan ke dalam kelas *Ascomycota*<sup>16</sup>. Setelah pemeriksaan mikroskopik, dilakukan identifikasi molekuler untuk mengkarakterisasi jenis fungi.

#### Kuantitas Asam Nukleat (Genomik DNA)

##### Hasil Ekstraksi

Ekstraksi DNA menjadi tahap awal yang harus dilakukan dalam identifikasi secara molekuler yaitu dengan melakukan Pemisahan genomik DNA. Pemisahan genomik Isolat IFAZ-6 dilakukan dengan Genomik DNA extraction with Quick-DNA Magbead Plus Kit (Zymo Research, D4081). Selanjutnya, dilakukan pengukuran kuantitas DNA dengan menggunakan Spektrofotometer Nanodrop<sup>17</sup>.

**Tabel 2.** Hasil pemeriksaan kuantitas genomik DNA dengan spektrofotometer nanodrop.

Kode Sampel	Kons. (ng/ $\mu$ l)	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Volum e ( $\mu$ l)
IFAZ-6	4.4	2.21	0.60	50

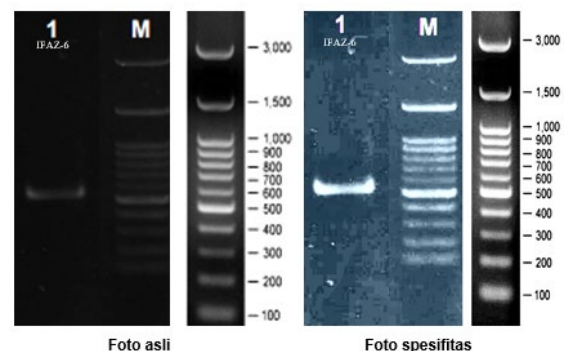
Pada tabel 2, pengukuran kuantitas DNA dilakukan dengan metode spektrofotometer nanodrop yang bertujuan mengetahui besaran konsentrasi dan kemurnian DNA. Konsentrasi DNA diukur absorbansinya pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 260 nm, kemurnian DNA dari kontaminasi diukur absorbansinya pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 260/280 nm dan 260/230 nm. Dilakukan pengukuran absorpsi pada panjang gelombang tertentu (230, 260, 280 nm) dikarenakan DNA memiliki struktur cincin aromatik basa nitrogen yang mampu mengabsorpsi sinar ultraviolet pada panjang gelombang tersebut<sup>17</sup>. Nilai absorbansi  $\lambda$  260/280 nm yang diperoleh

yaitu 2,21. Nilai absorbansi  $\lambda$  260/230 nm yaitu antara 0,60. Menurut Samrook dan Russell (1989), hasil ekstraksi DNA dikatakan murni apabila rasio absorbansi  $\lambda$  260/280 berada pada 1,8 – 2,0. Jika kemurnian DNA kurang dari 1,8 menunjukkan sampel DNA terkontaminasi oleh protein, apabila lebih tinggi dari 2 maka sampel DNA terkontaminasi RNA<sup>18</sup>. Pada perbandingan absorbansi  $\lambda$  260/230, DNA dikatakan murni ketika berada pada kisaran 2 – 2,2. Jika nilai lebih rendah dari 2 maka DNA terkontaminasi oleh karbohidrat, jika lebih dari 2 maka sampel DNA terkontaminasi trizol, fenol, guanidine HCl dan guanidine thiocyanate<sup>19</sup>. DNA yang akan di amplifikasi dengan PCR disebut sebagai DNA template. Meskipun dikatakan tidak murni, masih dapat digunakan untuk amplifikasi dengan PCR apabila primernya spesifik dengan DNA template. Oligonukleotida primer menjadi salah satu faktor keberhasilan dari reaksi PCR dikarenakan memiliki panjang pada rentang tertentu (18 – 30S rDNA) sehingga akan mempengaruhi probabilitas penemuan basa sekuens DNA<sup>20</sup>.

### **Amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction***

Amplifikasi DNA dilakukan dengan MyTaq HS Red Mix (Bioline, BIO-25048) menggunakan primer ITS (*Internal Transcribed Spacer*) yaitu ITS 1 dan ITS 4 yang spesifik untuk DNA fungi. Primer ITS 1

dan ITS 4 memiliki panjang 28S rDNA<sup>21</sup>. Jika primer yang digunakan terlalu pendek atau panjang, dapat mengurangi spesifitas penempelan primer pada template. Berdasarkan hasil penelitian, amplifikasi berhasil dilakukan dengan 1 siklus denaturasi awal (suhu 95°C selama 3 menit), 35 siklus untuk denaturasi (suhu 95°C selama 15 detik), *annealing* (suhu 52°C selama 30 detik), *extension* (72°C selama 45 detik) dan 1 siklus untuk *final extension* (suhu 72°C selama 3 menit) serta 1 siklus untuk pendinginan (suhu 4°C). Denaturasi dilakukan untuk memisahkan untai ganda dari DNA, *annealing* tahapan penempelan primer dan *extension* adalah pemanjangan untai DNA. Penentuan suhu pada saat *annealing* sangat mempengaruhi hasil PCR. Suhu yang tinggi dapat menyulitkan terbentuk ikatan primer sementara suhu yang rendah dapat membuat primer menempel pada DNA yang tidak spesifik<sup>22</sup>. Sampel isolat fungi akar tanaman bidara diantaranya IFAZ-6 diberi kode 1, pada gel agarose elektroforesis.



**Gambar 2.** Fragmen DNA produk PCR yang di elektroforesis dengan gel agarose yang tampak melalui transilluminator UV.

*Band* yang terbentuk dari pita DNA IFAZ-6 foto asli (Gambar 2.) terlihat tunggal namun kurang tebal menandakan bahwa DNA total yang diekstrak memiliki kontaminasi berlebih dari batas kontaminasi yang seharusnya. Berdasarkan data pada tabel 2, DNA yang dielektroforesis terkontaminasi senyawa organik, proses amplifikasi tetap dinyatakan berhasil dikarenakan tidak adanya *smear* atau ekor yang terbentuk pada hasil elektroforesis<sup>23</sup>.

### Hasil Sekuensing Produk PCR

```

Sequence Assembly 558bp
1      TCCGTAGTG AACCTGCGGA GGGATCATTA CCGAGTTTAC AACTCCAAA CCCATGTGAA
61     CATACTATC GTTGCTTCGG CGGGATCGCC CCGGGGCGCT CGTGTGCCC GGATCCGGCG
121    CCGGCTAGG AACCTTACT CTTGTTTTAT TTTGGAATCT TGTGAGTAGT TTTTCAAAAT
181    AAATAAAAC TTCAACAAC GGATCTCTTG GTTCTGGCAT CGATGAAGAA CGCAGCGAAA
241    TCCGATAGT AATGTGATT GCAGATTCA GTGATCATC GAATCTTTGA AGCAGCATG
301    CGCCGSCAG TATTCTGGG GGCATGCTG TCTGAGGTC ATTCAACCC TCATGCCCT
361    AGGGCGTGT GTTGGGGATC GGCCAAGGCC CGAAGGGAC GGCCGGCCC TAATCTAGT
421    GCGGACCCG TCGTGGCCTC CTCTGCGAAG TAGTATATT CCGCATCGGA GAGCAGGAG
481    CCCCTGCCG TAAACCCCA ACTTCCAAG GTTGACTCA GATCAGTAG GAATACCCG
541    TGAACCTAAG CATATCAA

```

**Gambar 3.** Jumlah pasang basa DNA isolat fungi endofit akar tanaman bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam.) IFAZ-6

Proses elektroforesis memerlukan langkah yang lebih lanjut untuk menghasilkan sekuens DNA yang akurat. Untuk menghasilkan DNA yang akurat, dilakukan perakitan untuk mendapatkan sekuens genomik DNA lengkap yang melibatkan pemilihan, pengurutan dan penggabungan fragmen tumpang tindih dalam urutan yang benar dengan melakukan teknik sekuensing<sup>24</sup>. Data sekuensing yang dihasilkan berupa basa nitrogen heterosiklik yang menjadi untaian nukleotida pembentuk DNA. Terdiri dari A (Adenin), G (Guanin), C (Sitosin) dan T (Timin). Adenin dan guanin adalah basa nitrogen purin

sedangkan sitosin dan timin merupakan basa nitrogen pirimidin<sup>25</sup>.

Dalam penelitian ini, analisis sekuensing DNA pada sampel IFAZ-6, ditemukan 558 bp pasang basa (*base pair*) (Gambar 3). Panjang sekuens DNA, dapat digunakan sebagai dasar untuk menganalisis sekuens DNA lebih rinci pada sampel dan membandingkannya dengan sekuens DNA organisme lain yang telah terdokumentasi<sup>26</sup>. Hal ini akan membantu dalam pemahaman yang lebih mendalam tentang keragaman genetik dan hubungan evolusioner antara sampel-sampel tersebut.

### Hasil BLAST Berdasarkan Database NCBI

Analisis BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dengan menggunakan database NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) digunakan untuk membandingkan sekuens DNA isolat fungi endofit dengan sekuens yang telah ada dalam database. Setelah diperoleh sekuens genomik, selanjutnya dilakukan anotasi genom untuk mengidentifikasi dan memberikan fungsi kepada gen-gen dalam genom tersebut yang melibatkan perbandingan dengan basis data referensi dan penggunaan alat bioinformatika untuk mengidentifikasi gen<sup>27</sup>.

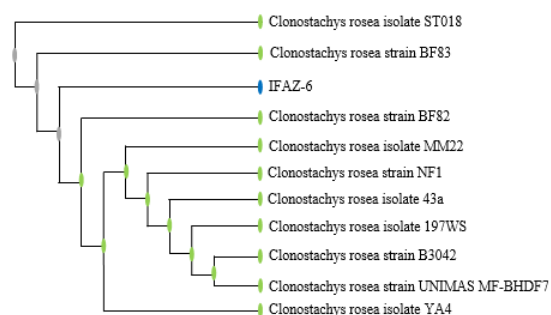
**Tabel 3.** Hasil Analisis BLAST

Spesies	Strain	Lokalitas	Kode GenBank
<i>Clonostachys rosea</i>	BF83	Hainan, China	OP794022.1
<i>Clonostachys rosea</i>	Isolate YA4	Palembang, Indonesia	OK513185.1
<i>Clonostachys rosea</i>	BF82	Hainan, China	OP794021.1
<i>Clonostachys rosea</i>	B3042	Selangor, Malaysia	MK204505.1
<i>Clonostachys rosea</i>	UNIMAS MF-BHDF7	Serawak, Malaysia	KM460936.1
<i>Clonostachys rosea</i>	Isolate MM22	Manisa, Turki	OP709811.1
<i>Clonostachys rosea</i>	NF1	Penang, Malaysia	KJ588219.1
<i>Clonostachys rosea</i>	Isolate 43a	Kaohsing City, Taiwan	MK203790.1
<i>Clonostachys rosea</i>	Isolate 197WS	Guwahati, India	MG396999.1
<i>Clonostachys</i> sp.	Isolate ST018	Selangor, Malaysia	MH512977.1

Pada tabel 3, hasil BLAST menunjukkan adanya kesesuaian sekuens DNA isolat dengan beberapa spesies fungi yang telah tercatat dalam database NCBI. Isolat IFAZ-6 memiliki kesesuaian tinggi dengan sekuens DNA dari spesies *Clonostachys rosea* strain BF83 yang telah tercatat dalam database dengan tingkat identitas sebesar 100% (Gambar 4). Hasil BLAST ini memberikan bukti lebih lanjut tentang keberadaan dan keaslian isolat fungi endofit yang diidentifikasi<sup>28</sup>. Kesesuaian sekuens DNA dengan spesies fungi yang ada dalam database NCBI menunjukkan bahwa isolat-isolat ini memiliki hubungan filogenetik dengan spesies tersebut<sup>29</sup>.

Dengan selesainya perakitan dan anotasi genom, data sekuens dapat digunakan untuk analisis filogenetik untuk mempelajari hubungan evolusi atau kekerabatan antara organisme.

### Analisis filogenetik

**Gambar 4.** Pohon filogenetika isolat IFAZ-6

Analisis filogenetika dilakukan dengan menggunakan metode *Neighbor-Joining Blast Tree* pada database NCBI untuk membangun pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan evolusioner antara isolat fungi endofit dengan spesies fungi yang telah tercatat dalam database<sup>30</sup>.

Metode *Neighbor-Joining Blast Tree* memanfaatkan hasil dari analisis BLAST untuk memperkirakan hubungan filogenetik antara sekuens DNA isolat dan sekuens DNA yang ada dalam database<sup>31</sup>. Metode ini menggunakan algoritma pengelompokan



dan pemodelan filogenetik untuk menghasilkan pohon filogenetik yang merepresentasikan keterkaitan evolusioner antara isolat dan spesies yang dihubungkan. Dalam analisis *Neighbor-Joining Blast Tree*, sekuens DNA isolat fungi endofit tanaman bidara yang telah dihasilkan dalam penelitian ini akan dibandingkan dengan sekuens DNA dari spesies fungi yang ada dalam database NCBI. Berdasarkan tingkat kesamaan sekuens DNA, metode ini akan mengklasifikasikan isolat ke dalam kelompok yang sesuai dalam pohon filogenetik (Gambar 5). Hasil analisis *Neighbor-Joining Blast Tree* akan memberikan informasi tentang hubungan evolusioner isolat dengan spesies fungi lainnya. Isolat yang memiliki kedekatan filogenetik yang tinggi dengan spesies tertentu dalam pohon filogenetik menunjukkan adanya hubungan filogenetik yang dekat dengan spesies tersebut. Hal ini dapat memberikan wawasan tentang kekerabatan dan keragaman genetik isolat fungi endofit dalam konteks spesies fungi yang telah tercatat dalam database.

#### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa isolat fungi endofit akar tanaman bidara (*Ziziphus mauritiana* Lam.) IFAZ-6 yang diamplifikasi dengan PCR menghasilkan DNA genom yang disekuensing menunjukkan pasang basa 568 bp. Setelah dianalisis BLAST pada NCBI,

isolat akar tanaman bidara memiliki hubungan kekerabatan dengan spesies *Clonostachys rosea*. dengan tingkat identitas sebesar 100%.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Dewi, R., Sutrisno, D., Safitri, M. R. Rasionalitas Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Infeksi Saluran Pernapasan Di Puskesmas Rawat Inap Kampung Laut Tahun 2019. *Ibnu Sina: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan - Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sumatera Utara*. 2022;21(1): 91-99.
2. Budiarto, B. R. Polymerase Chain Reaction (PCR): Perkembangan dan Perannya Dalam Diagnostik Kesehatan'. *BioTrends*. 2015;6(2):29-38.
3. Treasure U. N., Christiana A. C. Maduabuchi E. P., *et al.* The isolation, identification and antimicrobial activities of endophytic fungi from *Azadirachta indica*. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*. 2020;11(3):115-124. doi: 10.30574/gscbps.2020.11.3.0171.
4. Tolulope R., Adeyemi A., Erute M., Abiodun T. Isolation and screening of endophytic fungi from three plants used in traditional medicine in Nigeria for antimicrobial activity. *International Journal of Green Pharmacy*. 2015;9(1):58. doi: 10.4103/0973-8258.150929
5. Samapti, M. M. S. *et al.* Isolation and Identification of Endophytic Fungi from *Syzygium cumini* Linn and Investigation of Their Pharmacological Activities. *The Scientific World Journal*. 2022;10. doi: 10.1155/2022/9529665.
6. Panseeta, P., *et al.* Antiplasmodial and antimycobacterial cyclopeptide alkaloids from the root of *Ziziphus*

- mauritiana. *Phytochemistry*. 2011;72. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.03.003
7. Intan, A. E. K., Zuhro, F., & Ramadhani, R. L. Pharmacological Activities of Ziziphus Maritiana. *Infokes*. 2021;11(2):456-462.
  8. Ernawati, E., Senari, A. M. H. M., Melli, Y. E., Boimau, M. P. 'Agensi Hayati Jamur Endofit Daun dan Batang Apel Timor'. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 2023;11(1):23-24.
  9. Mardin, H., Syamsul., Husain, I. H., Akbar, M. N. Isolasi dan Identifikasi Jamur Mikroskopis Pada Ampas Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) Sebagai Sumber Belajar Biologi SMA. *Jurnal Pendidikan Biologi*. 2022;7(1):121.
  10. Zymo Research, D4081. Quick-DNA™ MagBead Plus Kit. *Instruction Manual Ver.2.1.1*. 2023, (Maret): 9. Hal. 6-7
  11. Wirada N, Fitriana, Rusli. Karakterisasi Molekuler Isolat Fungi Endofit IDGG 3 Daun Galing Galing (*Cayratia trifolia* L.) Dengan Metode *Polymerase Chain Reaction*. *Fakultas Farmasi, Universitas Muslim Indonesia*. 2020.
  12. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 2016;33(7). <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
  13. Saitou, N. and Nei, M.. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987; 4:406-425.
  14. Miller, G. A., R. Baeckwith, C. Fellbaum, D. Gross and K. Miller. Introduction to WordNet: An On-line Lexical Database. *International Journal of Lexicography*. 1990;3:235-312.
  15. Arif, S. N. H. Isolation of Endophytic Fungi From Patchouli Leaves (*Pogostemon cablin* Benth.) As Antibacterial Against Pathogenic Bacterial by Bioautography and Agar Diffusion'. *Journal Microbiology Science*. 2023;3(1):26.
  16. Mardin, H., Syamsul., Husain, I. H., Akbar, M. N. Isolasi dan Identifikasi Jamur Mikroskopis Pada Ampas Sagu (*Metroxylon sagu* Rottb.) Sebagai Sumber Belajar Biologi SMA. *Jurnal Pendidikan Biologi*. 2022;7(1):121.
  17. Alhadi, A., Zaelani, A., Andini, R., & Sulaiman, M. I. Optimasi Protokol Ekstraksi DNA Daun dari Pohon Jamblang dengan Kandungan Fenolik yang Tinggi Sebagai Sumber Bahan Nutrasetikal Potensial. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pertanian*. 2023;8(2):366.
  18. Zulkarnain, M. I., et al. Identifikasi Molekuler *Chlorella sorokiniana* menggunakan Marka ITS dan 18S rDNA serta Produksi Karotenoid dengan Perlakuan Cahaya. *Buletin Oseanografi Marina*. 2023;12(2):156.
  19. Dzikrina, H., et al. Penanda DNA: Uji Halal pada Makanan Olahan Daging Menggunakan Primer Multiplex PCR (*Polymerase Chain Reaction*). *Jurnal Bios Logos*. 2022;12(1):7.
  20. Salsabila, N. et al. Penentuan Sekuens Terbaik untuk Gen COI pada *Crocodylus rhombifer* Menggunakan Software *Perlprimer* dan *Primer Blast* Sebagai Bentuk Praktikum Saat Pandemi Covid-19. *Indonesian Journal of Science Learning*. 2021;2(1):18.
  21. Hermansyah, Sutami, N., & Miksusanti. Amplifikasi PCR Domain D1/D2 28S rDNA Menggunakan Primer ITS1 dan ITS4 Sampel DNA dari *Candida tropicalis* yang Diisolasi Dengan Metode Pendinginan. *Indonesian Journal of Pure and Applied Chemistry*. 2018;1(1):7.

22. Setyawati, R., Zubaidah, S. Optimasi Konsentrasi Primer dan Suhu *Annealing* dalam Mendeteksi Gen Leptin pada Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). *Indonesian Journal of Laboratory*. 2021;4(1):37.
23. Mawardi, A., Maury, H. K., dan Maladan, Y. Analisis Perbandingan Kualitas Produk Amplikon Gen PMSA-2 Antara Spesimen Spot Darah Kering dan Vena. *Jurnal Biologi Papua*. 2020;12(1):15.
24. Rahima, A., & Elfata, F. Pengembangan Epitop PMSA 1 Plasmodium falciparum Isolat Lokal Sikka Endemik Malaria'. *Biocaster: Jurnal Kajian Biologi*. 2022;2(3):161.  
<https://doi.org/10.36312/bjkb.v2i3.108>
25. Kurniawati, P., & Ranowati, R. *Modul Biokimia Jilid 1*. Program DIII Analisis Kimia, Fakultas MIPA. Universitas Islam Indonesia: Yogyakarta. 2018
26. Fachrial, E., Harmileni, dan Anggraini, S. *Pengantar Teknik Laboratorium Mikrobiologi dan Pengenalan Bakteri Asam Laktat*. 2022.
27. Sardi, A. Bioinformatic: Challenges in Intergrating Biological Information. *Jurnal Biologi Tropis*. 2022;22(4):1300.
28. Harvianto, A. F., Sutari, N. W., & Atmaja, I. W. D. Identifikasi Jamur Pada Pupuk Organik Cair (POC) Limbah Dapur di Desa Sanar Kauh. *Agrotrop: Journal on Agriculture Science*. 2022;12(1):144,152.
29. Zaunit, M. M., Verawati, Fera, O., & Zalri, D. F. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit Dari Daun Pauh (*Mangifera indica* Miq.) Serta Uji Aktivitas Antimikroba. *Jurnal Katalisator*. 2022;7(2):385.
30. Afrianti, R. Wardi, E. S., Putri, A. H., & Suryani S. Barcode DNA Tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Berdasarkan Gen ITS (Internal Transcribed Spacer). *Jurnal Katalisator*. 2023;8(1):124.
31. Sari, N., Fitri, F., Nurseha, T., Suliansyah, I., & Purwati, E. Penentuan Spesies Bakteri Asam Laktat (BAL) Melalui Analisis Sekuen Gen 16S rRNA dan Pendekatan Bioinformatika. *Prosiding Seminar Nasional, Sains dan Teknologi Terapan*. 2022;5:562.